

Daner Rosskamp Ferreira

**Efeito do uso de probiótico e diferentes enriquecedores na *Artemia*
sp. no cultivo de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi***

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do Grau de Mestre em
Aquicultura.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Daner Rosskamp

Efeito do uso de probiótico e diferentes enriquecedores na *Artemia* sp. no cultivo de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* / Daner Rosskamp Ferreira ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, 2017.

68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Peixes ornamentais. 3. Enzimas digestivas. 4. Microbiologia. I. Tsuzuki, Mônica Yumi . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Efeito do uso de probiótico e diferentes enriquecedores na *Artemia*
sp. no cultivo de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi***

Por

DANER ROSSKAMP FERREIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Dra. Monica Yumi Tsuzuki – *Orientadora*



Dr. Carlos Peres Silva - UFSC



Dr. Douglas da Cruz Mattos - UEFN



Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente na resolução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Mônica Yumi Tsuzuki pela oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e também pela orientação e ensinamentos durante o curso.

À toda equipe do LAPOM, sem citar nomes especiais para não correr o risco de esquecer alguém, pela cooperação, apoio e amizade durante esses anos, fundamental para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner e toda equipe do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da UFSC pelo auxílio no fornecimento de microalgas utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Peres Silva e toda equipe do Laboratório de Bioquímica de Insetos (LBI) da UFSC, em especial à Cristina Rios, pelo apoio e disponibilidade na realização das análises de atividades enzimáticas desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira e toda equipe do setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC pelo apoio e realização das análises microbiológicas presente nesta pesquisa.

Aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC pelos ensinamentos e apoio ao longo do curso.

Aos órgãos de fomento à pesquisa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e auxílio financeiro, essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus queridos amigos, que estão sempre comigo, me apoiando e dando forças para enfrentar os desafios da vida.

À Mariane Scheffer Nazaro pelo amor, parceria e companheirismo.

E por fim, à toda a minha família, em especial, aos meus pais Helvio e Karin, ao meu irmão Heber, aos meus sobrinhos André e Betina, as minhas tias Eliane e Marlene e aos meus avós Werner e Celeste que estão aqui comigo, e aos avós que me guardam do céu Herondino e Álida, por todo o amor e apoio incondicional durante toda minha vida.

RESUMO

O *Hippocampus reidi* é um cavalo-marinho altamente valorizado no mercado aquarista e considerado um animal com alto risco de extinção. O seu cultivo pode contribuir para o fornecimento destes peixes para suprir a crescente demanda do mercado, além de ajudar a reduzir a pressão sobre as populações naturais. A maioria das pesquisas para o seu cultivo está concentrada nos primeiros 20 dias após o nascimento (DAN), apontada como fase crítica, e pouco se conhece sobre a fase de juvenis e adultos. Com isso o objetivo do presente estudo foi testar dois tipos de enriquecedores, o produto comercial Red Pepper (Bernaqua, Bélgica) e a microalga *Nannochloropsis oculata*, e também o probiótico comercial AquaStar®Hatchery (Biomim®, Autria) no enriquecimento da *Artemia* sp., ofertada como alimento exclusivo para juvenis a partir de 30 DAN, e avaliar os parâmetros zootécnicos, a microbiologia e a atividade de enzimas digestivas em juvenis de *H. reidi* com 30, 45 e 60 DAN. Foram testados em triplicata: N- *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata*; NP- *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata* e probiótico; E- *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper; EP- *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper e probiótico. Aos 45 DAN, os tratamentos em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com *N. oculata*, independentemente do probiótico, mostrou melhores resultados em peso (N: $129,50 \pm 28,16$ mg e NP: $129,17 \pm 33,37$ mg), altura (N: $33,41 \pm 2,95$ mm e NP: $32,81 \pm 3,78$ mm), comprimento total (N: $42,32 \pm 3,35$ mm e NP: $41,60 \pm 4,28$ mm) e ganho de peso ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Já com 60 DAN, não houve influência do tipo de enriquecedor (*N. oculata* ou Red Pepper), e os melhores resultados foram obtidos somente nos tratamentos com probiótico (altura: NP: $39,30 \pm 2,14$ mm e EP: $42,15 \pm 2,02$ mm; comprimento total: NP: $49,84 \pm 2,36$ mm e EP: $53,02 \pm 2,10$ mm). Apesar do presente estudo mostrar que o probiótico afetou o crescimento de juvenis de *H. reidi* aos 60 DAN, este produto não teve efeito positivo no controle de bactérias potencialmente patogênicas bem como no aumento nas atividades enzimáticas analisadas (tripsina, quimotripsina e amilase). O presente estudo foi um dos poucos realizados com a espécie nestas idades, e os resultados apontam que esta fase de cultivo também pode ser considerada crítica para a viabilidade da sua produção em escala comercial.

Palavras-chave: Aquicultura. Peixes ornamentais. Enzimas digestivas. Microbiologia.

ABSTRACT

The seahorse *Hippocampus reidi* is highly valued by the aquarium industry and is considered an animal with high risk of extinction. Producing this fish in captivity can help supplying animals to the growing demand from the market and relieving the pressure on natural populations. The majority of the research done on seahorse rearing is mainly focused in the early stage (initial 20 days of life), commonly indicated as critical phase, and little is known about the juvenile and adult phases of seahorses. Therefore, the objective of the present study was to test two types of enrichers, one commercial product Red Pepper (Bernaqua, Belgium) and one microalgae *Nannochloropsis oculata*, as well as a commercial probiotic AquaStar® Hatchery (Biomin®, Autria) in the enrichment of *Artemia* sp., offered as exclusive food for juveniles of 30 DAB (days after birth). Zootechnical parameters, the microbiology and the activity of digestive enzymes in juveniles of *H. reidi* with 30, 45 and 60 DAB were evaluated. Four treatments were tested in triplicate: N- *Artemia* sp. enriched with *N. oculata*; NP- *Artemia* sp. enriched with *N. oculata* and probiotic; E- *Artemia* sp. enriched with Red Pepper; EP- *Artemia* sp. enriched with Red Pepper and probiotic. At 45 DAB, the treatments in which the *Artemia* sp. was enriched with the commercial enrichment, regardless the probiotic, showed best weight (N: 129.50 ± 28.16 mg and NP: 129.17 ± 33.37 mg), height (N: 33.41 ± 2.95 mm and NP: 32.81 ± 3.78 mm), total length (N: 42.32 ± 3.35 mm and NP: 41.60 ± 4.28 mm) and weight gain results ($p < 0.05$) compared with other treatments. On the other hand, at 60 DAB, the enrichment had no influence, and the best results were achieved in the probiotic treatments (height: NP- 39.30 ± 2.14 mm and EP- 42.15 ± 2.02 mm; total length: NP- 49.84 ± 2.36 mm and EP- 53.02 ± 2.10 mm). Although the present study showed that the probiotic affected growth of *Hippocampus reidi* juveniles at 60 DAB, it had no positive effect on the control of potentially pathogenic bacteria as well as on the increase in the enzymatic activities analyzed (trypsin, chymotrypsin and amylase). The present study was one of the few carried out with this species at these ages, and the results indicate that this stage of cultivation can also be considered critical for the viability of its commercial scale production.

Keywords: Aquaculture. Ornamental fish. Digestive enzymes. Microbiology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1	ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE CAVALOS-MARINHOS.....	13
1.1.1	<i>Hippocampus reidi</i>	15
1.2	O MERCADO DE CAVALOS-MARINHOS.....	18
1.3	O CULTIVO DE CAVALOS-MARINHOS.....	20
1.3.1	<i>Histórico</i>	20
1.3.2	<i>Dificuldades e Avanços</i>	21
1.3.2.1	Alimentação.....	21
1.3.2.2	Doenças e Probióticos.....	24
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	57
	ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE CAVALOS-MARINHOS

Os cavalos-marinhos são peixes ósseos agrupados em único gênero denominado *Hippocampus*, família Syngnathidae, ordem Gasterosteiformes (LOURIE et al., 2004). Além dos cavalos-marinhos, a família Syngnathidae possui representantes como os peixes-cachimbo, os cavalos-cachimbo e os dragões-do-mar (LOURIE et al., 2004). O número de espécies de cavalos-marinhos é alvo de discussão entre diversos grupos de pesquisa e taxonomistas em todo mundo. Lourie, Pollom e Foster (2016) reconhecem 41 espécies de cavalos-marinhos na mais recente revisão sobre o gênero *Hippocampus*. Por outro lado, a base de dados do Fishbase (FROESE; PAULY, 2017) elenca 54 espécies com nomes válidos, enquanto a *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES, 2017) possui atualmente na *Checklist of CITES species*, 51 espécies de cavalos-marinhos.

A taxonomia desses animais é bastante confusa, com atribuição de diversos nomes a uma única espécie e de variadas espécies agrupadas em um único nome científico (FOSTER; VICENT, 2004; OZÓRIO, 2008). Isto ocorre, sobretudo, por não haver grandes diferenças entre as espécies, e ao mesmo tempo, ocorrer variações entre os animais de uma mesma espécie, como colorações diferentes e presença ou não de espinhos e apêndices na pele (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010).

Os cavalos-marinhos estão distribuídos globalmente em áreas tropicais e subtropicais, entre as latitudes de 50° Sul e 50° Norte (LOURIE et al., 2004). Habitam regiões costeiras mais rasas, de até 30 metros de profundidade, como estuários, manguezais, recifes de corais e lagoas. Entretanto, há relatos de espécies encontradas em mares mais profundos de 40 a 100 metros de profundidade. São encontrados principalmente fixados a corais, algas, raízes, entre outros substratos, e também em fundos arenosos ou lodosos (FOSTER; VINCENT, 2004).

A maioria das espécies de cavalos-marinhos apresenta fidelidade ao local de habitat, vivendo em pequenas áreas, efetuando poucos e curtos deslocamentos, que aliados a esparsa distribuição e características reprodutivas peculiares, os tornam muito susceptíveis aos impactos ambientais locais, principalmente, por atividades antrópicas (LOURIE et al., 2004; CURTIS; VINCENT, 2006; HERNÁNDEZ et al., 2016).

As diferentes espécies de cavalos-marinhos apresentam características morfológicas, em relação ao corpo e funções básicas, muito semelhantes entre si, com algumas peculiaridades em cada espécie.

De maneira geral, os cavalos-marinhos apresentam a cabeça formando um ângulo reto em relação ao corpo, tronco curvo e uma calda preênsil. Possuem dois olhos que se movem de maneiras independentes, focinho tubular sem dentes e trato digestório sem estômago diferenciado. A pele dos animais é esticada por uma série de placas ósseas, visíveis externamente através de anéis ósseos no tronco e na calda. Apresentam duas pequenas nadadeiras peitorais perto dos opérculos e uma nadadeira dorsal, que servem como auxílio a estabilização e propulsão, respectivamente, além de uma nadadeira anal reduzida (FOSTER; VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004). São capazes de mudar a coloração do corpo, se adaptando melhor ao ambiente ou em períodos reprodutivos (LOURIE et al., 2004; ROSA et al., 2005). Dependendo da espécie, os cavalos-marinhos possuem alturas que variam de 2 centímetros (*Hippocampus denise*) até 35 centímetros (*Hippocampus abdominalis*) (LOURIE et al., 2004).

A expectativa de vida destes peixes, observada sobretudo em laboratórios, varia entre 1 a 5 anos, dependendo do tamanho da espécie. A mortalidade ao longo da vida é muitas vezes desconhecida (LOURIE et al., 2004). A principal causa de mortalidade na natureza é causada por predação por outros peixes e invertebrados, principalmente na fase de larvas e juvenis. Os animais adultos sofrem menor predação, sobretudo, pela camuflagem e por possuírem placas ósseas e espinhos melhores formados, tornando-se um alimento pouco apetitoso. Há relatos da presença de cavalos-marinhos no estômago de peixes pelágicos maiores, como dourado e atum, e também em aves, como pinguins (LOURIE et al., 2004; ROSA et al., 2005)

Muitas espécies de cavalos-marinhos apresentam dimorfismo sexual, sobretudo, pela presença da bolsa incubadora nos machos, que em períodos reprodutivos, apresenta maior volume (LOURIE et al., 2004). Em algumas espécies, os machos são maiores que as fêmeas, e a proporção do corpo também pode ser diferenciada, com machos possuindo maiores caudas e fêmeas maiores troncos (FOSTER; VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004).

Os cavalos-marinhos apresentam, em geral, comportamento monogâmico, porém há relatos de poligamia para algumas espécies (SILVEIRA, 2009). Estes animais estão sexualmente maduros entre 4 a 12 meses, dependendo da espécie. A reprodução é sexuada, com fêmeas produzindo ovos e machos espermatozóides. Após movimentos de cortejo e cópula, as fêmeas introduzem os ovócitos no orifício da bolsa incubadora dos machos, que os fertiliza na bolsa incubadora. Os machos incubam os ovos fecundados dentro da bolsa, onde ocorre todo o processo

de desenvolvimento do embrião até a liberação dos filhotes completamente formados, por um período de 9 a 30 dias, variando de acordo com cada espécie (FOSTER; VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004; SILVEIRA, 2009; SILVEIRA; FONTOURA, 2010). Durante o período de incubação realizado pelos machos, observa-se um dos mais sofisticados cuidados parentais em peixes, no qual os embriões recebem proteção, alimento, osmorregulação, aporte de cálcio para a formação do esqueleto, co-fatores de crescimento, entre outros cuidados. Após o período de incubação, os machos liberam as larvas, que já estão aptas à alimentação exógena (LOURIE et al., 2004; SILVEIRA, 2009; SILVEIRA; FONTOURA, 2010).

Os cavalos-marinhos são carnívoros e predadores de emboscada, permanecendo imóveis, na espreita, até a aproximação da presa que é capturada a partir da projeção do focinho e rápida sucção de água. Os animais adultos se alimentam, principalmente, de pequenos crustáceos, camarões carídeos, misidáceos e nemátodos, enquanto larvas e juvenis se alimentam de zooplâncton, principalmente, de copépodes e copepoditos (KENDRICK; HYNDES, 2005; CASTRO et al., 2008).

1.1.1 *Hippocampus reidi*

O cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae), popularmente conhecido como cavalo marinho do focinho longo (em inglês *longsnout seahorse*, *slender seahorse*), distribui-se ao longo da costa oeste do Oceano Atlântico, desde a Carolina do Norte (EUA) até o estado do Rio Grande do Sul (Brasil), incluindo o Golfo do México e o Mar do Caribe (LOURIE et al., 2004; ROSA et al., 2005). Dentre as 3 espécies que ocorrem no Brasil (*H. reidi*, *Hippocampus erectus* e *Hippocampus patagonicus*), o *H. reidi* é a espécie mais abundante e a única encontrada por toda costa brasileira (ROSA et al., 2007; SILVEIRA, 2011).

Os animais desta espécie ocupam áreas vitais, locais onde vivem e transitam, de 6 a 22 m², em baixas densidades populacionais (em média 0,026 indivíduos/m²), realizando pequenos deslocamentos, e estão geralmente associados a raízes de mangues, principalmente *Rhizophora mangle* e *Avicennia* sp., plantas marinhas como *Thalassia testudinum*, *Halophila* sp. e *Halodule wrightii*, macroalgas como *Caulerpa* spp. e *Phaeophyta* sp., ostras, cnidários, esponjas, tunicados entre outros substratos naturais e artificiais (ROSA; DIAS; BAUM, 2002; DIAS; ROSA, 2003; ROSA et al., 2007). Na coluna d'água, são encontrados desde a superfície até 55 m de profundidade, e em salinidades que variam

de 22 a 45 (LOURIE et al., 2004; HERCO; GIARRIZZO, 2007; ROSA et al., 2007).

A morfologia externa do *H. reidi* (Figura 1) é semelhante à morfologia básica de cavalos-marinhos, com algumas características peculiares e distintivas. A altura de indivíduos adultos varia entre 5 a 20 cm, com machos sendo um pouco maiores que as fêmeas (SILVEIRA, 2009; SILVEIRA; FONTOURA, 2010). De acordo com Lourie et al. (2004), a espécie possui 11 anéis no tronco e cerca de 35 (31 -39) anéis na cauda. O suporte da nadadeira dorsal é realizado por dois anéis do tronco e um da cauda. A relação entre os comprimentos da cabeça e do focinho é de 2,2 (2,0 – 2,5). A nadadeira dorsal possui, aproximadamente, 17 (16 -19) raios e a nadadeira peitoral 16 (15 – 17) raios. A coroa é pequena e arredondada, os espinhos estão ausentes ou em pequenas quantidades, o corpo é esguio, o focinho é longo e grosso e geralmente não apresentam apêndices na pele (LOURIE et al., 2004). A coloração dos animais pode variar entre preto, cinza, marrom, amarelo, laranja e vermelho (ROSA; DIAS & BAUM, 2002). É uma espécie considerada agástrica, pois não possui estômago macroscópico e nem microscópico, ocorrendo a passagem direta do esôfago para o intestino (NETO, 2000).

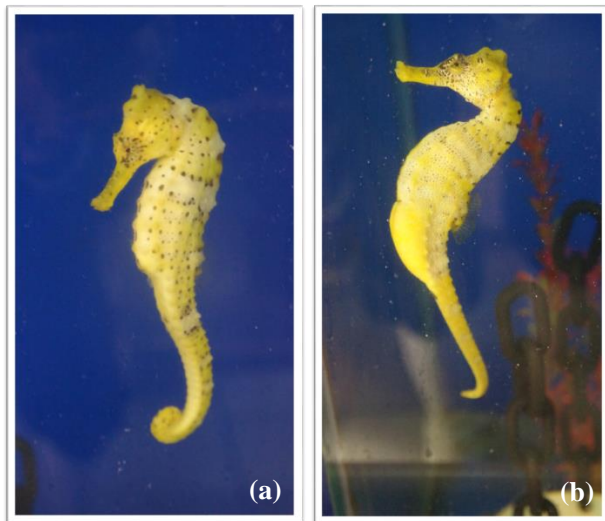


Figura 1. Reprodutores (a) fêmea e (b) macho de *H.reidi* mantidos no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Fonte: Autor, 2016.

Segundo Novelli et al. (2015), os animais quando nascem já apresentam alguns sistemas altamente desenvolvidos como o visual e o locomotor, enquanto outros, como o sistema digestório, o circulatório e o respiratório, aumentam a funcionalidade gradualmente. Os mesmos autores propõem quatro fases de desenvolvimento, desde o nascimento até 30 dias após o nascimento (DAN), com base em observações morfológicas externas, internas, e mudanças comportamentais.

No primeiro estágio de desenvolvimento, que compreende o período do dia de nascimento até 2 DAN, a boca e o ânus já estão abertos, e há a presença do saco vitelínico em torno do tubo digestivo. No segundo estágio, entre 3 e 8 DAN, o saco vitelínico e vesículas supranucleares do intestino posterior são reabsorvidas progressivamente, e o intestino continua com uma estrutura retilínea. No terceiro estágio, entre 9 e 18 DAN, são observadas as maiores mudanças, com a passagem do comportamento pelágico para o bentônico, e com os animais apresentando todos os elementos de juvenis, inclusive com a disposição geométrica e progressiva formação de voltas do intestino. No último estágio, de 20 a 30 DAN, os animais aumentam de tamanho, completam a formação da coroa e melhoram a capacidade preênsil da cauda, mantendo todas as características morfológicas internas do terceiro estágio.

A partir destas observações, os mesmos autores presumem que os animais recém-nascidos devem ser considerados larvas, pois apresentam um delicado processo de metamorfose, e que o termo juvenil pode ser mais bem empregado quando os animais estão com 18 a 20 DAN, pois já completaram o período de mudanças e apresentam a maioria das características morfológicas, fisiológicas e ecológicas de animais adultos.

No Brasil, a reprodução ocorre durante todo o ano, tendo um pico entre os meses de outubro a fevereiro (SILVEIRA, 2009). O período de incubação realizado pelos machos varia em torno de 2 semanas, dependendo principalmente da temperatura da água. Uma nova cópula acontece, geralmente, de um a dois dias após o nascimento das larvas da cópula anterior. Os ovos apresentam, em média, 1,2 mm de diâmetro e o tamanho da ninhada varia em torno de 200 a 1600 indivíduos. As larvas apresentam, aproximadamente 7 mm de comprimento ao nascerem (SILVEIRA; FONTOURA, 2010). Na natureza, apresentam, em geral, comportamento sexual monogâmico, porém, Silveira (2009) relatou um comportamento poligâmico em laboratório, com um único macho cortejando mais de uma fêmea e as vezes copulando com duas fêmeas diferentes em um intervalo de 24 h, em um aquário comunitário.

1.2 O MERCADO DE CAVALOS-MARINHOS

O mercado e o comércio internacional de cavalos-marinhos começaram a ser estudados somente em meados da década de 90 e início dos anos 2000 (FOSTER, 2016). Em pesquisas de campo foram verificadas um grande número de países que comercializavam grandes volumes de animais, e também o declínio de populações de cavalos-marinhos em alguns países fornecedores (FOSTER; WISWEDEL; VINCENT, 2014; FOSTER, 2016).

Com isso, em 2002, a CITES incluiu todas as espécies de cavalos marinhos na lista *CITES Appendix II*, implementada em 2004, sendo a primeira vez que esta organização concordou em regulamentar o comércio internacional de um peixe em 25 anos (VINCENT et al., 2013). A CITES é um acordo ambiental multilateral que visa assegurar a sobrevivência, na natureza, de espécies de animais e plantas através do controle do comércio internacional de espécies ameaçadas (FOSTER; WISWEDEL; VINCENT, 2014). As espécies listadas na *CITES Appendix II* possuem o comércio permitido, porém controlado, uma vez que estas espécies correm o risco de extinção sem a regulamentação de comércio (FOSTER, 2016).

A inclusão das espécies de cavalos-marinhos na CITES, promoveu um melhor conhecimento do comércio desses animais, porém este comércio continua sendo algo complexo e que demanda muitos esforços e pesquisas para obtenção de dados mais confiáveis (FOSTER, 2016). A exemplo, estima-se que mais de 20 milhões de animais são comercializados por ano, e apenas 6 milhões são relatados à CITES (FOSTER; WISWEDEL; VINCENT, 2014).

O mercado de cavalos-marinhos é composto basicamente por dois produtos principais, animais vivos para o mercado de peixes ornamentais, e o de animais mortos e secos que abastece, principalmente, o mercado da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), e em menor escala lojas de *souvenirs* e curiosidades (FOSTER; WISWEDEL; VINCENT, 2014; FOSTER, 2016).

A MTC utiliza cavalos-marinhos há milhares de anos, em vários tratamentos, essencialmente relacionados a função urogenital, reprodutiva, dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico. Os principais compostos extraídos dos cavalos-marinhos são esteróides, elementos minerais, aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos (CHEN; WANG; HUANG, 2015). Muitos estudos farmacológicos modernos apontam várias bioatividades dos compostos de cavalos-marinhos, tais como agentes antitumorais (ZHU, 2005), antienvhecimento (SHE et al.,

1995), antifadiga (PENG; CHEN, 2005), antiartrite (RYU et al., 2010) e antioxidante (QIAN et al., 2008), e para o tratamento de oligospermia (XU et al., 2014) e disfunção erétil (XU et al., 2003).

Hong Kong, Taiwan, China, Japão e Singapura estão entre os principais países consumidores de cavalos-marinhos secos utilizados na MTC, que são fornecidos, sobretudo, pela Tailândia, Guiné, China, Senegal, Malásia e Vietnam (FOSTER, 2016). Já os principais países compradores de cavalos-marinhos vivos, para o mercado aquarista, são os EUA, França, Canada, Reino Unido, Holanda e Alemanha. Este mercado é abastecido, principalmente, pelo Vietnam, Sri Lanka, Indonésia, Austrália, Brasil e México (FOSTER, 2016).

Um estudo realizado em 2016, com dados relatados a CITES, entre os anos de 2004 a 2011 sobre o comércio de cavalos-marinhos, revelou que a comercialização de animais secos dominou o mercado destes animais no período, com cerca de 98% de todo o volume anual comercializado, do qual, apenas 0,01% tiveram origem, supostamente, de cativeiro (FOSTER, 2016). O volume médio do comércio de animais vivos, durante o mesmo período, foi de aproximadamente 116.000 indivíduos por ano (com variação entre 22.000 a 172.000 indivíduos por ano), e ao contrário do comércio de animais secos, foi relatado que 53% em 2004 e 29% em 2011 do volume total de animais vivos comercializados foi proveniente de cultivo (FOSTER, 2016). Apenas cinco espécies, *Hippocampus trimaculatus*, *Hippocampus spinosissimus*, *Hippocampus keloggi*, *Hippocampus kuda* e *Hippocampus algiricus*, representam mais de 91% de todo volume comercializado, sobretudo, na forma de animais secos. Já o comércio de cavalos-marinhos vivos foi dominado por duas espécies principais, *H. kuda* (média anual de 65.000, com variação entre 5.000 – 99.000 indivíduos) e *H. reidi* (29.000, 8.100 – 53.000 indivíduos) (FOSTER, 2016).

No mercado aquarista, os animais com padrões de colorações amarelos e laranjas são os mais valorizados. A mudança de coloração varia de acordo com a espécie, tamanho e idade dos animais, e conforme as condições ambientais (LIN; LIN; HUANG, 2009). Hora e Joyeux (2009) observaram o início da mudança de coloração em juvenis de *H. reidi* somente após 30 dias de nascimento dos animais, nos indivíduos maiores. Desta forma, os animais para o mercado aquarista são comercializados principalmente na fase de juvenis ou adultos, quando já apresentam colorações mais atrativas e valorizadas.

No Brasil, os dados sobre o mercado interno são deficitários e subestimados, carecendo de fontes confiáveis e dados oficiais. Rosa et al. (2011) por meio de pesquisas de campo e entrevistas, realizadas entre

2001 a 2009, abrangendo grande parte do território nacional (18 estados), constatou que o comércio de cavalos-marinhos secos, no período, foi destinado, quase que na sua totalidade, para práticas medicinais caseiras ou como artigo religioso, e em menor escala como artesanato. De acordo com os entrevistados, como artigo religioso, os animais são usados como amuleto ou em práticas religiosas de religiões afro-brasileiras, e na medicina caseira, no tratamento de doenças respiratórias como asma e bronquite, e também em tratamentos para calvície, gastrite e tuberculose (ROSA et al., 2011).

Segundo Rosa et al. (2011), os preços de animais secos variaram entre 0,02 a 17,59 dólares, no período da pesquisa. A variação nos preços dependeu do tamanho e estado de conservação dos animais, e do nível dos vendedores, como vendedores intermediários ou finais. O comércio interno brasileiro de cavalos marinhos vivos destinou-se totalmente ao mercado aquarista, e os preços de comercialização, no período da pesquisa, variaram entre 1,04 a 18,00 dólares, dependendo, principalmente, da cor dos animais.

Atualmente, as três espécies de cavalos-marinhos com ocorrência no Brasil estão incluídas na Lista de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção vigente (Portarias MMA nº 445/2014), sendo classificadas na categoria de ameaça Vulnerável (VU) (MMA, 2014), resultado da sobre-explotação e da diminuição drástica das populações em ambiente naturais. As espécies classificadas nesta categoria de ameaça ficam protegidas de modo integral, incluída entre outras medidas, a proibição da sua captura, transporte, armazenamento, guarda, manejo, beneficiamento e comercialização salvo algumas exceções previstas na portaria, no qual é previsto o uso sustentável, desde que regulamentado e autorizado pelos órgãos federais competentes (MMA, 2014).

Em 2016, as três espécies de cavalos-marinhos encontradas no Brasil também foram inseridas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Ambientes Coralíneos, o Pan Corais, que estabelece de acordo com a Portaria nº 19, de 9 de março de 2016, estratégias prioritárias de conservação para espécies de peixes e invertebrados aquáticos consideradas ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2016).

1.3 O CULTIVO DE CAVALOS-MARINHOS

1.3.1 Histórico

O primeiro relato do cultivo de cavalos-marinhos nascidos em cativeiro foi em 1957, no sul da China, realizado pela empresa *Shantou*

Mariculture Test Farm na Província de Guangdong, com a espécie *H. trimaculatus*. Na década de 70 e início da década de 80, muitos esforços de cultivos comerciais surgiram na China, e muitas publicações indicavam o domínio da técnica de cultivo de cavalos-marinhos (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010). Porém, questões como vulnerabilidade a doenças, dietas inadequadas e insucessos econômicos demonstraram que os cultivos iniciais na China eram mais cultivos experimentais do que comerciais.

No mesmo período, institutos de pesquisa e aquários públicos no Japão, Austrália e Venezuela, iniciaram pesquisas com o cultivo de cavalos-marinhos, porém em escala experimental (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010). O desenvolvimento e expansão do cultivo de cavalos-marinhos ocorreu somente na década de 90, principalmente, na Austrália, EUA e Nova Zelândia, impulsionado pelos avanços das técnicas de cultivo em pequenas escalas, sobretudo com a espécie *H. abdominalis* (WOODS, 2000; KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010).

1.3.2 Dificuldades e Avanços

Devido ao aumento do interesse de cultivo e demanda por cavalos-marinhos, sobretudo para a MTC, muitos estudos foram publicados na década de 90 e nos anos 2000, fornecendo uma gama maior de conhecimento sobre as diversas espécies de cavalos-marinhos, quanto a sua biologia, ecologia e técnicas de cultivo (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010, OLLIVOTO, 2011). Porém, alguns aspectos importantes para o cultivo comercial de cavalos-marinhos ainda não foram bem elucidados, como por exemplo a alta mortalidade dos animais, principalmente, nas fases iniciais de cultivo (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010; LIN et al., 2016).

As razões para estas altas mortalidades não são muito bem compreendidas, porém, alguns autores citam a falta de conhecimento das exigências nutricionais dos animais nas diferentes fases de vida, fontes alimentares inadequadas para o cultivo e doenças provenientes da criação em cativeiro como principais causas de mortalidade (FELÍCIO et al., 2006; OLIVOTTO, 2008; KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010; WILLADINO et al., 2012; LIN et al., 2016; NOVELLI et al., 2016).

1.3.2.1 Alimentação

Assim como no cultivo da maioria de peixes ornamentais marinhos, o cultivo de cavalos-marinhos utiliza espécies de rotíferos,

náuplios e metanáuplios de *Artemia* sp. como principais itens alimentares nas fases iniciais do cultivo (WOODS, 2003; FOSTER; VINCENT, 2004; OLIVOTTO, 2008). Porém, a utilização destes itens alimentares nestas fases, consideradas críticas, nem sempre oferecem um aporte nutricional adequado para uma ótima sobrevivência, sobretudo por apresentarem um perfil de ácidos graxos insuficientes, baixa digestibilidade, e em alguns casos tamanho inadequado para serem predados (LIN et al., 2007; OLIVOTTO, 2008; WILLADINO et al., 2012).

Como alternativa, pesquisas utilizando outros itens alimentares como copépodes, misidáceos e zooplâncton selvagem, mostraram melhores resultados, aumentando a sobrevivência e o crescimento dos animais comparado aos cultivos em que os animais foram alimentados exclusivamente com rotíferos e *Artemia* sp., como por exemplo na larvicultura de cavalos-marinhos *H. reidi* (OLIVOTTO et al., 2008; HORA; JOYEUX, 2009) e de *H. kuda* (CELINO et al., 2012). Apesar da melhora significativa nos desempenhos zootécnicos dos animais cultivados com fontes alimentares alternativas, a utilização desses alimentos pode tornar o cultivo de cavalos-marinhos economicamente inviável, devido aos altos custos e dificuldades encontradas na coleta e cultivo desses tipos de alimento vivo, em decorrência da necessidade de grande quantidade de alimento vivo por um longo período de cultivo uma vez que a maioria das espécies de cavalos-marinhos não aceita alimento inerte e nem mesmo alimento fresco congelado (WOODS, 2003; FELÍCIO et al., 2006; OLLIVOTO et al., 2008; KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010).

Desta forma, mesmo com a deficiência nutricional da *Artemia* sp., este organismo ainda é o mais utilizado no cultivo de cavalos-marinhos, por conta da facilidade de obtenção e cultivo em grande escala (WOODS, 2003; OLLIVOTO et al., 2008). Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para encontrar o melhor tipo de enriquecedor que faça com que a *Artemia* sp. adquira um perfil nutricional mais balanceado, aumentando a sobrevivência dos cavalos marinhos e assim a viabilidade econômica dos cultivos (CONCEIÇÃO et al., 2010; NOVELLI et al., 2016). Algumas pesquisas já demonstraram que utilização da *Artemia* sp. em diferentes estágios de vida e enriquecida com diferentes produtos, propiciou uma boa sobrevivência e crescimento para algumas espécies de cavalos-marinhos cultivados, como *H. abdominalis* (WOODS, 2005; MARTINEZ-CARDENAS; PURSER, 2007), *Hippocampus guttulatus* (PALMA; BUREAU; ANDRADE, 2011) e *Hippocampus hippocampus* (LENOIR et al., 2008).

Produtos comerciais e emulsões ricas em lipídeos e proteínas, contendo principalmente óleos de peixes, entre outros macros e micronutrientes, estão entre os principais produtos utilizados para o enriquecimento da *Artemia* sp. Porém alguns destes produtos acabam resultando em *Artemia* sp. rica em lipídeos neutros ou com excesso de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ocorrendo um desbalanceamento entre energia e essencialidade dos ácidos graxos, além do excesso de triglicerídeos e desbalanceamento entre proteínas/lipídeos (CONCEIÇÃO et al., 2010).

Muitos estudos, ao longo dos últimos 20 anos, demonstram a importância de PUFA na nutrição de larvas de peixes. O ácido docosa-hexaenoico (DHA, 22:6n-3), o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido araquidônico (AA) são considerados ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento de larvas e juvenis de peixes marinhos, sobre tudo, por desempenhar um papel especializado na estrutura e função da membrana neural (DHA), e como substrato para a formação de eicosanoides (EPA e AA), um grupo de moléculas biologicamente ativas que está relacionado a diversas funções fisiológicas, o que afeta diretamente na sobrevivência, bem como no crescimento e tolerância a fatores estressantes desses organismos (WATANABE, 1993; SARGENT et al., 1999; COPEMAN et al., 2002).

Outros produtos, como a utilização de organismos unicelulares (fungos, bactérias e microalgas), entre eles *Schizochytrium* sp., *Cryptocodinium* sp., *Nannochloopsis* sp. e *Haematococcus pluvialis*, podem conferir ao alimento vivo altos níveis de ácidos graxos essenciais como DHA, EPA e ARA, e de astaxantina, respectivamente, além de elevados níveis de lipídeo polares (CONCEIÇÃO et al., 2010). Estes organismos possuem várias vantagens em relação a emulsões de produtos contendo óleos, entre eles a proteção das células que faz com que seja menor a exposição dos PUFA a atmosfera, evitando a oxidação dos ácidos graxos, e evitando contaminações dos enriquecedores por bactérias, além de conterem outros nutrientes naturais e não somente lipídeos (CONCEIÇÃO et al., 2010).

Na busca para encontrar o melhor enriquecedor que satisfaça as necessidades nutricionais dos cavalos marinhos, além das análises de índices e desempenho zootécnico dos animais mediante a alimentação com diferentes enriquecedores, análises do perfil e atividade de enzimas digestivas podem ser utilizadas como indicadores do estado nutricional dos animais, além de fornecer informações importantes para o aprimoramento do manejo alimentar (GAWLICKA et al., 2000; NOVELLI et al., 2016). Entre as principais análises enzimáticas, as

análises de peptidases serínicas pancreáticas, como a tripsina e a quimotripsina, são consideradas muito importantes em espécies agástricas, como o *H. reidi*, pois o alimento é digerido no intestino, onde o pH se mantém alcalino (WALFORD; LAM, 1993). Além das análises da atividade de proteases, a amilase é outra enzima importante no processo de digestão de espécies agástricas, atuando no intestino no auxílio a digestão de carboidratos (HIDALGO et al., 1999).

1.3.2.2 Doenças e Probióticos

Doenças em cavalos-marinhos compõem outro fator que causa grandes mortalidades nos cultivos. As principais doenças relatadas são úlceras espalhadas pelo corpo, bolha de gás, superinflação da bexiga natatória, hemorragia hepática e inflamação gastrointestinal, que estão relacionadas à baixa qualidade de água e ambiente de cultivo, dietas pobres em nutrientes, e infecções causadas por agentes patogênicos, como fungos e bactérias (LIN et al., 2016).

Entre as principais doenças causadas por agentes patogênicos em cavalos-marinhos, as vibrioses são as mais comuns, relatada em diversas pesquisas no cultivo de muitas espécies de cavalos-marinhos (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010). Os v́brios são encontrados normalmente em ambientes marinhos, e os surtos de doenças acabam ocorrendo pela exposição aos agentes infecciosos na presença de fatores de estresse, e são uma das causas mais importantes em perdas econômicas nos cultivos (AUSTIN; AUSTIN, 2007; MARTINS et al., 2010). As principais espécies de v́brios que acometem os animais em cultivo causando mortalidades, são o *Vibrio harveyi* em *H. kuda* (TENDENCIA, 2004), *Vibrio parahaemolyticus* em *H. erectus* (LIN et al., 2016), e *Vibrio alginolyticus* em *H. guttulatus* e *H. reidi* (BALCÁZAR et al., 2010; MARTINS et al., 2010).

Antibióticos compõem uns dos medicamentos mais utilizados no tratamento para o controle das doenças e enfermidades causadas por v́brios e outros tipos de bactérias na aquicultura, porém a eficácia destes medicamentos depende da atuação específica para as variadas estirpes bacterianas e em muitos casos, vacinas específicas podem se tornar muito onerosas para os produtores (KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010). Além disso, os antibióticos também podem atuar contra bactérias benéficas ao organismo e conferir maior resistência a bactérias patogênicas, prejudicando os cultivos (BANERJEE; RAY, 2017). Algumas substâncias alternativas aos convencionais antibióticos vêm sendo testadas há algum tempo na aquicultura, entre elas uma variedade

de aditivos alimentares, incluindo os fitoterápicos e os probióticos (AKHTER et al., 2015).

Probióticos consistem em microrganismos vivos, incluindo uma ampla gama de bactérias gram positivas e gram negativas, bacteriófagos, microalgas e leveduras, que quando administrados em quantidades adequadas, podem proporcionar benefícios de saúde, resistência a doenças e incremento no ganho de peso e crescimento dos animais submetidos a estes microrganismos (AKHTER et al., 2015). A atividade antagonista contra diferentes doenças bacterianas e virais, a produção de enzimas extracelulares, a competição pelo local de colonização, a modulação imune e a competição pela absorção de ferro estão entre as principais propriedades conferidas aos probióticos (BANERJEE; RAY, 2017). Na aquicultura, a administração de probióticos pode ser realizada a partir da adição de probióticos diretamente na água do cultivo, incluídos na composição de alimentos formulados ou adicionados no enriquecimento de alimento vivo. Cada método de administração atua de maneira diferente, proporcionando diversos benefícios, como por exemplo, a melhora na qualidade de água quando adicionados direto no ambiente de cultivo, ou coibindo a proliferação de bactérias patogênicas no alimento vivo quando administrada junto a esses organismos (BANERJEE; RAY, 2017).

Entre os muitos microrganismos utilizados como probióticos na aquicultura, algumas espécies de bactérias são amplamente utilizadas, principalmente espécies pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas (BANERJEE; RAY, 2017). As bactérias ácido lácticas são um grupo de bactérias gram positivas, catalase negativa, não formadoras de esporos que geralmente se desenvolvem em condições com baixas concentrações de oxigênio ou estritamente anaeróbicas, tendo como produto final da sua fermentação, principalmente o ácido láctico entre outras substâncias (KLEIN et al., 1998; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A eficácia da utilização de probióticos pode ser verificada a partir da melhora na sobrevivência, bem como na melhora do desempenho zootécnico, como ganho de peso e crescimento dos organismos cultivados. Outros estudos comprovam a eficácia dos probióticos no controle de doenças a partir de estudos *in vitro*, através de desafios com organismos patogênicos. Outro método para analisar o efeito do probiótico nos organismos e cultivos é a partir de análises microbiológicas, comprovando a efetiva colonização de bactérias probióticas no trato digestório dos hospedeiros e também na melhora da qualidade de água (BANERJEE; RAY, 2017).

Em um estudo realizado com larvas (1 a 16 DAN) de *H. reidi*, houve melhora do desempenho de crescimento (peso, altura e comprimento total) quando foi adicionado um probiótico comercial na água de cultivo, comparado ao cultivo sem probiótico, apesar das análises microbiológicas não apontarem diferenças nas contagens bacterianas (bactérias heterotróficas, *Vibrio* spp. e bactérias ácido lácticas) entre os tratamentos (MASSUCATTO, 2016). Como a maioria dos pesquisadores apontam a fase inicial de cultivo a mais problemática para a viabilidade do cultivo de cavalos-marinhos, sobretudo pela alta mortalidade nos primeiros 20 dias de cultivo, a maioria das pesquisas sobre o cultivo destes animais estão concentradas apenas nesta fase, sendo poucos estudos conduzidos com juvenis e adultos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aprimorar o cultivo de cavalo-marinho *H. reidi* na fase juvenil, a partir da avaliação de diferentes enriquecedores e uso de probiótico no enriquecimento da *Artemia* sp. ofertada como alimento exclusivo aos animais a partir de 30 dias após o nascimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *H. reidi* alimentados com *Artemia* sp. enriquecida com diferentes enriquecedores (*Nannochloropsis oculata* e enriquecedor comercial) e probiótico comercial;
- Avaliar o efeito da *Artemia* sp. enriquecida com diferentes enriquecedores (*N. oculata* e enriquecedor comercial) e probiótico comercial na atividade de enzimas digestivas e aspectos microbiológicos do cavalo-marinho *H. reidi*;

Este trabalho será submetido à revista científica *Aquaculture – An International Journal* e está formatado conforme as normas da revista.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito do uso de probiótico e diferentes enriquecedores na *Artemia* sp. no cultivo de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi*

ABSTRACT

The seahorse *Hippocampus reidi* is highly valued by the aquarium industry and is considered an animal with high risk of extinction. Producing this fish in captivity can help supplying animals to the growing demand from the market and relieving the pressure on natural populations. The majority of the research done on seahorse rearing is mainly focused in the early stage (initial 20 days of life), commonly indicated as critical phase, and little is known about the juvenile and adult phases of seahorses. Therefore, the objective of the present study was to test two types of enrichers, one commercial product Red Pepper (Bernaqua, Belgium) and one microalgae *Nannochloropsis oculata*, as well as a commercial probiotic AquaStar® Hatchery (Biomim®, Autria) in the enrichment of *Artemia* sp., offered as exclusive food for juveniles of 30 DAB (days after birth). Zootechnical parameters, the microbiology and the activity of digestive enzymes in juveniles of *H. reidi* with 30, 45 and 60 DAB were evaluated. Four treatments were tested in triplicate: N- *Artemia* sp. enriched with *N. oculata*; NP- *Artemia* sp. enriched with *N. oculata* and probiotic; E- *Artemia* sp. enriched with Red Pepper; EP- *Artemia* sp. enriched with Red Pepper and probiotic. At 45 DAB, the treatments in which the *Artemia* sp. was enriched with the commercial enrichment, regardless the probiotic, showed best weight (N: 129.50 ± 28.16 mg and NP: 129.17 ± 33.37 mg), height (N: 33.41 ± 2.95 mm and NP: 32.81 ± 3.78 mm), total length (N: 42.32 ± 3.35 mm and NP: 41.60 ± 4.28 mm) and weight gain results ($p < 0.05$) compared with other treatments. On the other hand, at 60 DAB, the enrichment had no influence, and the best results were achieved in the probiotic treatments (height: NP- 39.30 ± 2.14 mm and EP- 42.15 ± 2.02 mm; total length: NP- 49.84 ± 2.36 mm and EP- 53.02 ± 2.10 mm). Although the present study showed that the probiotic affected growth of *Hippocampus reidi* juveniles at 60 DAB, it had no positive effect on the control of potentially pathogenic bacteria as well as on the increase in the enzymatic activities analyzed (trypsin, chymotrypsin and amylase). The present study was one of the few carried out with this species at these ages, and the results indicate that this stage of cultivation can also be considered critical for the viability of its commercial scale production.

Keywords: Aquaculture. Ornamental fish. Digestive enzyme. Microbiology.

1. INTRODUÇÃO

Hippocampus reidi Ginsburg, 1933 é uma espécie de cavalo-marinho que se distribui ao longo da costa oeste do Oceano Atlântico, desde a Carolina do Norte (EUA) até o estado do Rio Grande do Sul (Brasil), incluindo o Golfo do México e o Mar do Caribe, sendo encontrada em áreas estuarinas, manguezais, recifes de corais e lagoas (Lourie et al., 2004; Rosa et al., 2005).

Assim como outras espécies de cavalos-marinhos, a espécie *H. reidi* está incluída, desde 2004, na lista Appendix II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), o que torna a comercialização mundial destes animais controlada. Deve-se ressaltar que, a maioria dos cavalos-marinhos comercializados no mundo provém da captura de animais selvagens. O *H. reidi* é comercializado principalmente na fase de juvenis ou adultos, quando já apresentam colorações mais atrativas e valorizadas, sendo a segunda espécie de cavalos-marinhos mais comercializados na forma viva no mundo, com números que variam de 8.100 a 53.000 indivíduos por ano (Foster, 2016).

O cultivo de cavalos-marinhos em cativeiro pode contribuir para o fornecimento desses animais para a crescente demanda do mercado, além de ajudar a reduzir a pressão sobre as populações naturais, que aliado a outras ações com abordagens interdisciplinares como a proteção de ecossistemas, gestão da pesca e controle do comércio, podem fazer com que as espécies se tornem cada vez menos vulneráveis a extinção (Vincent, 1996; Olivotto et al., 2011).

Muitos autores apontam a fase inicial de cultivo como a mais problemática para a viabilidade do cultivo de *H. reidi*, sobretudo pela alta mortalidade encontrada nos primeiros 20 dias de cultivo, devido principalmente, à falta de conhecimento das exigências nutricionais dos animais nas diferentes fases de vida, fontes alimentares inadequadas para o cultivo e doenças provenientes da criação em cativeiro (Olivotto, 2008; Koldewey and Martin-Smith, 2010; Willadino et al., 2012; Mélo et al., 2015; Novelli et al., 2016). Por isso, a maioria das pesquisas sobre o cultivo desta espécie estão concentradas apenas na fase inicial de cultivo, sendo poucos estudos conduzidos com animais até a fase de comercialização da espécie (juvenis e adultos).

No cultivo inicial de *H. reidi*, alguns estudos utilizando zooplâncton selvagem ou copépodes cultivados obtiveram bons resultados de sobrevivência e crescimento das larvas em detrimento a alimentação convencional com rotífero e *Artemia* sp. (Olivotto et al., 2008; Hora and Joyeux, 2009; Willadino et al., 2012). Porém, a utilização de zooplâncton selvagem ou copépode pode tornar o cultivo de cavalos-marinhos economicamente inviável devido aos altos custos e dificuldades encontradas na coleta e cultivo desses tipos de alimento vivo, em decorrência da necessidade de grande quantidade de alimento vivo uma vez que a maioria das espécies de cavalos-marinhos não aceita alimento artificial inerte e nem mesmo alimento fresco congelado, sendo necessário o emprego de alimento vivo até a fase adulta (Woods, 2003b; Felício et al., 2006; Ollivoto et al., 2008; Koldewey and Martin-Smith, 2010).

Desta forma, a substituição de zooplâncton selvagem ou copépodes cultivados por *Artemia* sp. no cultivo de juvenis de *H. reidi* pode tornar a atividade economicamente mais atrativa devido a facilidades de cultivo desse tipo de alimento vivo. Entretanto, a utilização de *Artemia* sp. nem sempre oferece um aporte nutricional adequado para uma ótima sobrevivência e crescimento, sobretudo por apresentar um perfil inadequado de ácidos graxos e baixa digestibilidade, sendo necessário o enriquecimento com produtos ricos em ácidos graxos essenciais entre outros nutrientes (Lin et al., 2007; Olivotto, 2008).

Na busca por um melhor enriquecedor que satisfaça as necessidades nutricionais dos cavalos-marinhos, além das análises de índices e desempenho zootécnico dos animais mediante a alimentação com diferentes enriquecedores, análises do perfil e atividade de enzimas digestivas podem ser utilizadas como indicadores do estado nutricional destes peixes, além de fornecer informações importantes para o aprimoramento do manejo alimentar (Gawlicka et al., 2000; Novelli et al., 2016). Novelli et al. (2016) foram os primeiros pesquisadores a realizar análises enzimáticas com a espécie *H. reidi*, fornecendo informações importantes para o avanço do cultivo da espécie, porém o estudo foi conduzido apenas com animais recém-nascidos até completarem 20 dias após o nascimento (DAN).

Além do aspecto alimentar, outro problema encontrado nos cultivos de cavalos-marinhos são as doenças, principalmente causadas por microrganismos patogênicos, como as bactérias do gênero *Vibrio* (Lin et al., 2016). Antibióticos estão entre os principais medicamentos utilizados no tratamento para o controle das doenças e enfermidades causadas por *Vibrio* spp. e outras espécies de bactérias na aquicultura,

porém a eficácia destes medicamentos depende da atuação específica para as variadas estirpes bacterianas e em muitos casos, vacinas específicas podem se tornar muito onerosas para os produtores (Koldewey and Martin-Smith, 2010). Além disso, os antibióticos também podem atuar contra bactérias benéficas ao organismo e conferir maior resistência a bactérias patogênicas, prejudicando os cultivos (Banerjee and Ray, 2017).

Como alternativa aos antibióticos, o uso de probióticos vem sendo cada vez mais empregado na aquicultura, que além do benefício da atividade antagonista contra diferentes doenças bacterianas e virais, pode auxiliar no desempenho zootécnico dos animais como promotores de crescimento (Banerjee and Ray, 2017).

Com isso o objetivo do presente estudo foi testar diferentes enriquecedores, microalga *Nannochloropsis oculata* e enriquecedor comercial Red Pepper (Bernaqua, Bélgica), e um probiótico comercial AquaStar® Hatchery (Biomim®, Autria) no enriquecimento da *Artemia* sp., ofertada como alimento exclusivo para animais a partir de 30 DAN, e avaliar os parâmetros zootécnicos, a microbiologia e a atividade de enzimas digestivas em juvenis de *H. reidi* com 30, 45 e 60 DAN.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reprodutores

Adultos selvagens do cavalo-marinho *H. reidi* foram coletados na costa do município de Guarapari (20°40' 00" S; 40°29' 51" W), Espírito Santo (autorização SISBIO/ICMBio n° 46575-5) e enviados ao Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado no município de Florianópolis (27°35' 48" S; 48°32' 47" W), Santa Catarina, Brasil.

A partir destes animais coletados, foram formados oito casais, mantidos separadamente em nove aquários de vidro de 90 L, interligados a um sistema fechado de recirculação de água com um reservatório de 200 L equipado com filtro germicida UV (55 W), filtro *shark bag* 100 µm, desnatador de proteínas (*Skimmer* 85 W) e filtro biológico composto por 1,5 Kg de anéis filtrantes de vidro sinterizado de 15 mm. Os aquários eram revestidos lateralmente e por uma película adesiva de coloração azul e possuíam substratos artificiais (plantas e correntes de plástico) para fixação dos reprodutores, além de um ponto de aeração com pedra porosa.

A temperatura e a salinidade da água eram aferidas diariamente e mantidas em $26,52 \pm 1,00$ °C (média \pm desvio padrão) e $27,17 \pm 4,35$ ‰, respectivamente. O pH, amônia total e nitrito eram mensurados

semanalmente. O pH manteve-se em $8,0 \pm 0,5$ e os níveis de amônia total e nitrito permaneceram abaixo de 0,25 mg/L. A medição do pH, salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido foram realizadas a partir do medidor multiparâmetro AK88 (Akso®, Brasil). A medição dos níveis de amônia total e nitrito foram realizadas a partir de testes colorimétricos Labcon Test (Alcon®, Brasil). A iluminação do sistema era feita pela parte superior dos aquários com fotoperíodo controlado de 12 h luz e 12 h escuro.

Os animais eram alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia com pós-larvas congeladas de camarão marinho *Litopenaeus vanammei*. Uma vez por semana, as pós-larvas eram embebidadas no enriquecedor Red Pepper por aproximadamente 10 minutos antes de serem ofertadas aos animais. Antes de cada alimentação, o fundo dos aquários era sifonado para a remoção de restos de alimento e excretas.

Sob estas condições, os reprodutores foram mantidos por 2 anos e se reproduziam constantemente, com uma produção média de $1173,61 \pm 489,53$ filhotes por casal, e variação entre os partos de 13 a 20 dias.

2.2 Larvicultura

Larvas recém-nascidas, com peso úmido (P) de $1,97 \pm 0,89$ mg, altura (A) de $4,01 \pm 0,69$ mm e comprimento total (CT) de $5,74 \pm 0,70$ mm, provenientes de dois casais de reprodutores, foram selecionadas ao acaso, e transferidas dos aquários dos reprodutores para três tanques de larvicultura na densidade de estocagem de 10 larvas/L (500 larvas/tanque). Os tanques de larvicultura eram de fibra de vidro, com capacidade de 100L, formato cilíndrico e coloração interna preta, sendo utilizado um volume útil de 50 L. Os tanques estavam interligados a um sistema fechado de recirculação de água, contendo também um reservatório, filtros mecânicos e biológicos semelhantes ao do sistema de manutenção dos reprodutores. Utilizou-se o sistema fechado nesta fase para um maior controle, especialmente da salinidade. Hora et al. (2016) verificaram melhor sobrevivência e crescimento de larvas de *H. reidi* em salinidades entre 10 a 25 ‰, comparado a outras salinidades. Além do melhor desempenho das larvas na salinidade próxima a 25 ‰, evitou-se o choque osmótico das mesmas já que estas nasceram em tanques com salinidade semelhante.

Os parâmetros de qualidade de água eram aferidos a cada dois dias e mantiveram-se em $25,59 \pm 0,68$ °C, salinidade de $26,56 \pm 0,68$ ‰, oxigênio dissolvido de $6,12 \pm 0,32$ mg/L, pH de $8,02 \pm 0,12$ e níveis de amônia total e nitrito abaixo de 0,25 mg/L. A iluminação do sistema era

feita pela parte superior dos tanques com fotoperíodo controlado de 12 h luz e 12 h escuro. Cada tanque possuía 2 pontos de aeração perto da superfície sem pedras porosas. A partir do 8º dia de cultivo, plantas de plástico foram adicionadas aos tanques como substrato para a fixação dos animais. A saída de água, na parte superior dos tanques de cultivo, possuía telas de 500 µm para a passagem do alimento vivo e retenção das larvas de *H. reidi*. O sistema de recirculação era interrompido no período com iluminação e acionado no período sem iluminação para o controle do alimento vivo no sistema e manutenção da qualidade de água.

As larvas recém-nascidas foram alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. (High 5, Inve®, Bélgica) e copépodes selvagens. Os cistos de *Artemia* sp. eram eclodidos conforme instrução do fabricante, e o zooplâncton selvagem era coletado com uma rede de zooplâncton de 200 µm em um viveiro de terra escavado ao lado do LAPOM, que possui troca de água constante com a Lagoa da Conceição, Florianópolis. O zooplâncton selvagem era previamente selecionado a partir de filtragens e analisado em microscópio estereoscópico onde foi verificada a predominância de copépodes do gênero *Acartia*. O alimento vivo era previamente filtrado em telas de 500 µm e retidos em telas de 100 µm, e enxaguado em água marinha filtrada, para limpeza e seleção de tamanho, antes de ser ofertado às larvas de *H. reidi*. A alimentação era realizada uma vez ao dia, com densidade de alimento vivo ofertada de 5 náuplios de *Artemia* sp./mL e 1 copépode selvagem/mL. Junto com o alimento vivo, foi adicionada a microalga *N. oculata* em cada tanque de larvicultura, na densidade de 10⁶ células/mL. Antes de cada alimentação, o fundo dos tanques era sifonado para a remoção de excretas e larvas mortas.

Quinze dias após o nascimento (DAN), as larvas que sobreviveram dos três tanques de larvicultura, foram transferidas para um único tanque de polipropileno, com formato retangular, de coloração branca e com volume útil de 300 L, ligado a um sistema aberto de circulação de água marinha previamente tratada por dois filtros *shark bag* de 50 µm e 15 µm, e filtro germicida UV (55 W). A vazão de entrada de água no tanque de cultivo era de 50 L/h. Os parâmetros de qualidade de água foram medidos a cada dois dias. A temperatura manteve-se em 25,35 ± 0,65 °C, salinidade 33,22 ± 0,54 ‰, oxigênio dissolvido 6,15 ± 0,23 mg/L, pH 8,04 ± 0,09 e níveis de amônia total e nitrito permaneceram abaixo de 0,25 mg/L.

Este tanque de cultivo possuía sistema de iluminação e aeração, bem como substratos de fixação semelhantes aos tanques do sistema inicial de larvicultura. A alimentação era ofertada uma vez ao dia, e nessa

fase de cultivo, era composta exclusivamente por metanúplios de *Artemia* sp. (24 h) enriquecidos durante 12 h com enriquecedor Red Pepper. A densidade de alimento vivo ofertada foi de 6 metanúplios/mL. Junto com o alimento vivo adicionou-se também microalga *N. oculata* na densidade de 10^6 células/mL e o sistema de circulação de água era interrompido durante 6 horas. Antes da alimentação diária, o fundo do tanque era sifonado para a remoção de excretas e animais mortos.

A transferência das larvas do sistema fechado de recirculação de água para o sistema aberto de circulação de água serviu como um período de aclimação dos animais ao novo sistema a ser utilizado no experimento dos juvenis com 30 DAN, sobretudo pelo aumento da salinidade. Ao final do período total de larvicultura, 30 dias iniciais de cultivo, a taxa de sobrevivência dos animais foi de 55,6 %.

2.3 Efeito do enriquecimento do alimento vivo e do probiótico no desempenho de juvenis de cavalo-marinho *H. reidi*

Neste experimento, testou-se em triplicata os seguintes tratamentos: N- metanúplios de *Artemia* sp. enriquecidos com a microalga *N. oculata*; NP- metanúplios de *Artemia* sp. enriquecidos com *N. oculata* e probiótico AquaStar®Hatchery; E- metanúplios de *Artemia* sp. enriquecidos com enriquecedor Red Pepper; EP- metanúplios de *Artemia* sp. enriquecidos com enriquecedor Red Pepper e probiótico AquaStar®Hatchery.

Juvenis com 30 DAN, pesando $42,68 \pm 16,03$ mg, medindo $A = 23,23 \pm 3,96$ mm, $Ct = 29,84 \pm 4,70$ mm, foram transferidos do tanque final da larvicultura e aleatoriamente distribuídos em 12 aquários de vidro de 20 L com sistema aberto de circulação de água semelhante ao do tanque final da larvicultura. A densidade de estocagem foi de 3,4 juvenis/L (68 juvenis/aquário). Os aquários possuíam formato retangular e eram revestidos lateralmente por uma película adesiva de coloração azul.

Foram utilizadas plantas de plástico para a fixação dos animais e um ponto de aeração sem pedra porosa em cada aquário. A saída de água dos aquários possuía uma tela de 1000 µm que era substituída por uma tela de 200 µm antes da alimentação para a retenção do alimento nos aquários. Após o período alimentar de 6 h, a tela de 1000 µm era recolocada para a filtragem do excesso de alimento.

Núplios de *Artemia* sp. foram eclodidas conforme instrução do fabricante e após a eclosão eram lavados, contados e transferidos para potes de vidro de 2 L com água marinha filtrada, semelhante à do

ambiente de cultivo dos juvenis de cavalos marinhos. A densidade de estocagem, para o enriquecimento, em cada pote de vidro foi de $1,5 \times 10^5$ náuplios/L. O enriquecimento do alimento vivo foi realizado em sala climatizada a 25 °C com iluminação constante. Os enriquecedores e o probiótico eram adicionados aos potes em duas doses, 12 h e 24 h após a eclosão da *Artemia* sp. Antes da segunda adição de enriquecedores, os metanáuplios eram lavados e a água do pote renovada. Um novo procedimento de lavagem dos metanáuplios era feito antes de serem ofertados aos juvenis de *H. reidi*.

A alimentação era realizada uma vez ao dia, com metanáuplios de *Artemia* sp. (36 h) enriquecidos durante 18 h, na densidade de alimento vivo de 5 metanáuplios/mL. Antes da alimentação, o fundo dos aquários era sifonado para a remoção de excretas, e de juvenis mortos, que eram contabilizados.

A microalga *N. oculata*, utilizada no enriquecimento do alimento vivo, foi cultivada no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da UFSC e mantida no LAPOM em meio F/2 Guillard (Guillard, 1972), com água marinha filtrada, clorada e declorada, sob constante iluminação a uma temperatura de 25 °C. A microalga foi utilizada na fase de crescimento exponencial, na densidade de 10^6 células/mL.

O enriquecedor comercial Red Pepper (Bernaqua, Bélgica), de acordo com os fabricantes, é composto por água, microalgas, óleo de peixe micro encapsulado e óleo de ácido araquidônico. A concentração do enriquecedor foi utilizada conforme instruções do fabricante de 0,75 g/L. O probiótico comercial AquaStar® Hatchery (Biomim®, Austria), de acordo com os fabricantes, é composto por cepas de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus reuteri* e *Pediococcus acidilactici*, a uma contagem total de células probióticas de 3×10^{12} unidades formadoras de colônia (UFC)/kg. O probiótico foi utilizado no enriquecimento do alimento vivo e adicionado junto com os outros enriquecedores (*N. oculata* ou Red Pepper), na concentração indicada pelo fabricante de 0,01 g/L.

Os parâmetros de qualidade de água eram medidos a cada dois dias. A temperatura e a salinidade foram controladas em $27,6 \pm 1,3$ °C e $33,8 \pm 0,7$ ‰, respectivamente. O pH e oxigênio dissolvido permaneceram em $8,2 \pm 0,1$ e $5,5 \pm 0,6$ mg/L, respectivamente, e níveis de amônia total e nitrato abaixo de 0,25 mg/L. A iluminação era feita por lâmpadas de 60 W a 1 m da superfície dos aquários com fotoperíodo controlado de 12 h luz e 12 h escuro.

2.4 Biometria e índices zootécnicos

Os animais amostrados para biometria e para as análises realizadas nesta pesquisa, foram eutanasiados em uma solução de 1 mL de solução estoque de eugenol (1mL de eugenol puro em 9 mL de álcool absoluto) em 1 L de água marinha filtrada, em conformidade com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFSC, nº 5196080616).

As medidas de comprimento e altura foram realizadas através do software *DinoCapture*, a partir de uma câmera USB *Dino-Eye* acoplada a uma lupa estereoscópica binocular na medição das larvas, e paquímetro analógico com precisão de 0,02 mm na medição dos juvenis (a partir de 30 DAN). O peso dos animais foi aferido a partir de uma balança digital com precisão de 3 casas decimais.

Os dados da biometria foram utilizados para calcular: 1) Ganho médio de peso (mg/peixe) = $(P_f - P_i)/P_i$, onde P_f é o peso úmido final e P_i o peso úmido inicial (Palma et al., 2011); 2) Fator de condição (K) = $100 P / Ct^3$, onde P é o peso úmido (mg) e Ct o comprimento total (mm) (Willadino et al., 2012).

A altura (A) foi definida como a distância entre a ponta da coroa e cauda desenrolada, e comprimento total (Ct) como a soma da altura mais o comprimento da cabeça (Lourie et al., 2004). A taxa de sobrevivência foi estimada a partir do número de juvenis mortos por dia de cada tratamento.

2.5 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC, em juvenis com 30, 45 e 60 DAN. Para tal, realizou-se um pool de três animais por réplica (9 animais por tratamento) para animais com 30 e 45 DAN, e um pool de dois animais por réplica (6 animais por tratamento) dos animais com 60 DAN. As análises com 60 DAN foram realizadas apenas nos tratamentos “NP” e “E” devido ao número insuficiente de animais para as análises nos outros tratamentos.

Os animais foram pesados e homogeneizados em um gral após remoção da cabeça. Posteriormente foram diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3% (SSE) e semeados em meio de cultura Ágar Marinho para contagem de bactérias heterotróficas totais e Ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) para contagem de *Vibrio* spp. As amostras semeadas nas placas de Petri foram incubadas em estufa e a

temperatura foi mantida em 30°C para Ágar Marinho e TCBS. Após 24 h de incubação foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC).

2.6 Análises enzimáticas

As análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Insetos (LBI/BQA) da UFSC. Os animais amostrados foram imediatamente congelados e mantidos a uma temperatura aproximada de -20 °C para a análises enzimáticas. O extrato enzimático foi preparado a partir da maceração de animais inteiros em homogeneizador Potter-Ekvehjem. No homogeneizado enzimático das amostras de 30 e 45 DAN foram utilizados 5 animais/mL, enquanto para as amostras de 60 DAN foram utilizados 4,5 animais/mL. O número de animais por mL foi determinado em pré-testes anteriores. Todo o material utilizado no processo de preparação das amostras foi mantido em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 15.500 x g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, apenas o conteúdo sobrenadante foi coletado para a realização das análises enzimáticas.

Nos ensaios para determinar as atividades de tripsina e quimiotripsina foram utilizados os substratos bz-R-pNa (N- α -Benzoyl-DL-arginine-4-p-nitroanilida e suc-AAPF-pNa (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida), respectivamente, conforme Erlanger et al. (1961) e DelMar et al. (1979). Foram utilizados 0,05 mL do homogeneizado mais 0,05 mL do substrato a 2 mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 7,5. As microplacas de 96 poços contendo as amostras foram inseridas no leitor de microplacas Tecan Infinite® (Tecan, EUA), no qual foram lidas a absorbância das amostras a 410 nm em quatro tempos diferentes (15, 30, 45 e 60 minutos). Uma unidade de atividade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato/min, determinado a partir da curva padrão de p-nitroanilina.

Os ensaios para determinar as atividades de amilase foram realizados conforme protocolo originalmente adaptado de Noelting e Bernfeld (1948), por meio da detecção da presença de grupos redutores na reação com o ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS). O substrato foi preparado contendo solução de amido 2% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 6,5. Para os ensaios foi utilizado 0,025 mL do substrato e 0,025 mL do homogeneizado. As amostras foram incubadas em banho maria 30°C, e depois as reações foram interrompidas em quatro tempos (15, 30, 45 e 60 minutos). A interrupção das reações foi realizada a partir da adição de 0,1 mL de DNS. Após a última interrupção todos os tubos

que continham as amostras foram cobertos com papel alumínio e aquecidas a 100°C por 5 min, às quais foram posteriormente adicionados 0,1 mL de água destilada. As leituras foram realizadas em microplaca em absorbância de 550 nm no leitor de microplacas Tecan Infinite® (Tecan, EUA). A atividade da amilase (U) equivale a 1 µmol de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de glicose.

2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software Statistica Statsoft® 13.0. Os dados de peso, altura, comprimento, fator de condição, ganho de peso, sobrevivência, enzimáticos e microbiológicos foram submetidos a análise de variância Two-way (ANOVA bifatorial), após os testes de normalidade e homogeneidade, Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Após a análise de variância dos dados, foram aplicados o teste de Tukey para os resultados que apontaram diferenças entre os tratamentos. Os dados microbiológicos da amostra de 60 dias foram analisados a partir do teste de Mann-Whitney. Os dados de unidade formadoras de colônia (microbiológicos) foram transformados e são apresentados em Log₁₀. As análises foram aplicadas com um nível de significância de 5% e os dados estão representados em valores de média ± desvio padrão.

3. RESULTADOS

Maior taxa de sobrevivência (11,5%) de juvenis de *H. reidi* com 60 DAN foi observada no tratamento em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com a microalga *N. oculata* e com probiótico AquaStar® Hatchery (NP) em relação à observada nos tratamentos em que a *Artemia* sp. foi enriquecida somente com *N. oculata* (N), e com enriquecedor Red Pepper mais o probiótico AquaStar® Hatchery (EP), com porcentagens de 7,9% e 5,5%, respectivamente. A sobrevivência observada no tratamento em que a *Artemia* sp. foi enriquecida somente com enriquecedor Red Pepper (E) foi de 9,7%, não se diferenciando estatisticamente dos tratamentos NP e N (Figura 1). Houve interação entre os fatores ($p = 0,001$).

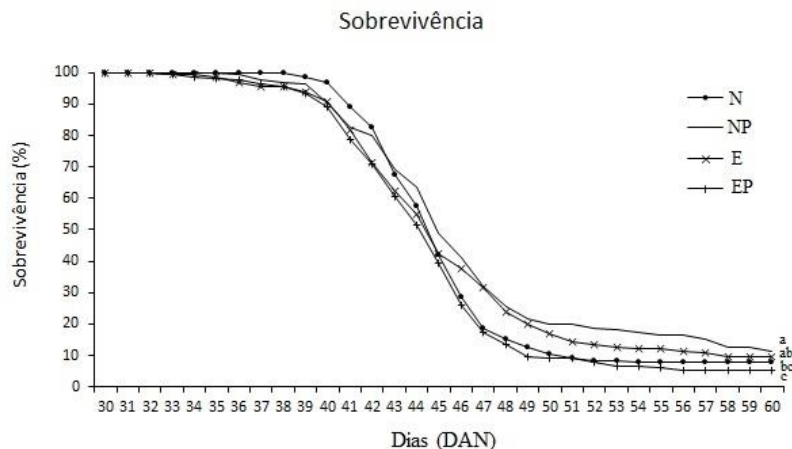


Figura 1. Sobrevivência (%) de juvenis de *H. reidi* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao final do experimento. Siglas: N – *Artemia* sp. enriquecida com microalga *N. oculata*; NP – *Artemia* sp. enriquecida com microalga *N. oculata* e probiótico; E – *Artemia* sp. enriquecida com enriquecedor Red Pepper; EP – *Artemia* sp. enriquecida com enriquecedor Red Pepper e probiótico.

Em juvenis com 45 DAN, os parâmetros zootécnicos (Tabela 1) de peso úmido, altura, comprimento total e ganho de peso tiveram diferenças significativas somente em relação ao tipo de enriquecedor, sem interação entre os fatores. Foram observados valores superiores em relação a estas variáveis, nos tratamentos em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com a microalga *N. oculata* (N e NP) comparado aos tratamentos em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com enriquecedor Red Pepper (E e EP), independente do probiótico. Não houve diferenças estatísticas no fator de condição entre os tratamentos testados.

Já em juvenis com 60 DAN, não houve diferenças estatísticas em relação ao tipo de enriquecedor, mas sim em relação ao probiótico, sem interação entre os fatores. Nesta idade, os maiores resultados de altura e comprimento total foram observados nos tratamentos em que foi adicionado o probiótico AquaStar® Hatchery no enriquecimento da *Artemia* sp. (NP e EP), comparado aos tratamentos em que não foi utilizado o probiótico (N e E). Não houve diferenças estatísticas no fator de condição e no ganho de peso entre os tratamentos testados.

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) dos parâmetros zootécnicos de juvenis de *H. reidi*, de acordo com os diferentes tratamentos e dias após o nascimento (DAN). Não houve interação entre os diferentes fatores em relação a todas as variáveis ($p > 0,05$). Letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao tipo de enriquecedor e letras maiúsculas em relação ao uso de probiótico. Siglas: N – *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata*; NP – *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata* e probiótico; E – *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper; EP – *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper e probiótico.

Tratamento	Peso (mg)	Altura (mm)	Comprimento (mm)	Fator de Condição (K)	Ganho de Peso (GP)
45 DAN					
N	129,50 \pm 28,16 ^{aA}	33,41 \pm 2,95 ^{aA}	42,32 \pm 3,35 ^{aA}	0,169 \pm 0,014	2,27 \pm 0,71 ^{aA}
NP	129,17 \pm 33,37 ^{aA}	32,81 \pm 3,78 ^{aA}	41,60 \pm 4,28 ^{aA}	0,178 \pm 0,025	2,26 \pm 0,84 ^{aA}
E	119,33 \pm 31,97 ^{bA}	32,25 \pm 3,39 ^{bA}	41,01 \pm 3,97 ^{bA}	0,171 \pm 0,019	2,01 \pm 0,81 ^{bA}
EP	110,67 \pm 23,09 ^{bA}	31,02 \pm 3,53 ^{bA}	39,68 \pm 3,86 ^{bA}	0,181 \pm 0,054	1,79 \pm 0,58 ^{bA}
60 DAN					
N	222,00 \pm 37,26	38,30 \pm 2,96 ^{aB}	48,76 \pm 3,43 ^{aB}	0,192 \pm 0,027	4,60 \pm 0,94
NP	213,67 \pm 15,30	39,30 \pm 2,14 ^{aA}	49,84 \pm 2,36 ^{aA}	0,173 \pm 0,015	4,39 \pm 0,39
E	204,00 \pm 57,73	37,48 \pm 4,38 ^{aB}	47,66 \pm 5,22 ^{aB}	0,185 \pm 0,020	4,15 \pm 1,46
EP	261,89 \pm 27,66	42,15 \pm 2,02 ^{aA}	53,02 \pm 2,10 ^{aA}	0,175 \pm 0,008	5,61 \pm 0,70

Em relação aos dados microbiológicos, os valores de unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias heterotróficas totais (BHT) e *Vibrio* spp. em juvenis com 30 DAN foram de $6,10 \pm 0,60$, $4,41 \pm 0,64$, respectivamente.

Em juvenis com 45 DAN, não foram detectadas diferenças estatísticas em relação a contagem de BHT e *Vibrio* spp. Em juvenis com 60 DAN, os dados de UFC em relação a *Vibrio* spp. foram maiores no tratamento NP comparado ao tratamento E. Não foi possível realizar as análises microbiológicas em animais com 60 DAN dos tratamentos N e EP devido à falta de número amostral decorrente da baixa sobrevivência nesses tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão) da contagem bacteriana, em unidades formadoras de colônias (UFC), apresentados em Log_{10} , dos diferentes tratamentos de acordo com dias após o nascimento (DAN) de juvenis de *H. reidi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Sigla: sd – sem dados; N – *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata*; NP – *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata* e probiótico; E – *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper; EP – *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper e probiótico.

Tratamento	BHT (Log UFC/g)	<i>Vibrio</i> spp. (Log UFC/g)
45 DAN		
N	$6,52 \pm 0,05$	$4,22 \pm 0,05$
NP	$6,52 \pm 0,10$	$4,22 \pm 0,10$
E	$6,57 \pm 0,11$	$4,26 \pm 0,11$
EP	$6,52 \pm 0,02$	$4,21 \pm 0,02$
60 DAN		
N	sd	sd
NP	$8,52 \pm 0,45$	$8,56 \pm 0,40^a$
EP	sd	sd
E	$8,13 \pm 0,68$	$6,83 \pm 0,26^b$

Conforme o resultado dos dados das análises de enzimas digestivas (Tabela 3), foram observadas nos juvenis com 30 DAN, valores de atividades enzimáticas (U/mg) de tripsina, quimotripsina e amilase, de $6,68 \pm 0,30$, $6,16 \pm 0,07$ e $24,64 \pm 1,33$, respectivamente.

Nos juvenis com 45 DAN, os maiores valores observados, de todas as atividades enzimáticas, foram no tratamento E. Em relação as atividades de tripsina e quimotripsina, o tratamento NP apresentou valores maiores que N, que por sua vez apresentou valores maiores que EP. Em relação a atividade de amilase, o segundo maior resultado foi observado no tratamento N, seguido dos tratamentos NP e EP.

Nos juvenis com 60 DAN, os maiores valores para todas as atividades enzimáticas também foram observados no tratamento E. Em relação a tripsina e quimotripsina, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos N e EP, que tiveram valores inferiores ao tratamento NP. Já em relação a amilase, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos N e NP, que tiveram valores inferiores ao tratamento EP.

Tabela 3: Média (\pm desvio padrão) de atividades enzimáticas (U/mg), dos diferentes tratamentos de acordo com dias após o nascimento (DAN) de juvenis de *H. reidi*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Siglas: N – *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata*; NP – *Artemia* sp. enriquecida com *N. oculata* e probiótico; E – *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper; EP – *Artemia* sp. enriquecida com Red Pepper e probiótico

Tratamento	Tripsina (U/mg)	Quimiotripsina (U/mg)	Amilase (U/mg)
45 DAN			
N	$18,95 \pm 0,53^c$	$14,69 \pm 0,42^c$	$35,57 \pm 0,96^b$
NP	$20,44 \pm 0,77^b$	$16,17 \pm 0,43^b$	$34,28 \pm 1,04^c$
E	$35,73 \pm 0,35^a$	$30,35 \pm 0,63^a$	$57,60 \pm 1,15^a$
EP	$14,05 \pm 0,40^d$	$13,35 \pm 0,32^d$	$18,33 \pm 0,47^d$
60 DAN			
N	$20,46 \pm 0,73^c$	$22,23 \pm 0,86^c$	$26,18 \pm 0,34^c$
NP	$24,65 \pm 0,85^b$	$23,69 \pm 0,73^b$	$26,11 \pm 0,46^c$
E	$47,56 \pm 0,94^a$	$46,30 \pm 0,96^a$	$62,05 \pm 0,76^a$
EP	$19,69 \pm 0,45^c$	$22,45 \pm 0,80^c$	$31,82 \pm 0,56^b$

4. DISCUSSÕES

Um dos principais entraves para a viabilização da produção de cavalos-marinhos em escala comercial utilizando alimentos congelados ou ração constitui o processo de transição do alimento vivo para estes tipos de alimentos, uma vez que cavalos-marinhos são predadores visuais e não aceitam muito bem alimentos inertes, mesmo na fase de juvenis (Woods, 2003a).

Woods (2003b) alimentando juvenis de cavalos-marinhos *H. abdominalis* com 30 e 60 DAN obtiveram melhores resultados de sobrevivência e crescimento quando os animais foram alimentados exclusivamente com *Artemia* sp. enriquecida comparado à alimentação em que houve a inclusão de alimento inerte ou congelado junto com *Artemia* sp., e somente alimento inerte. Lin et al. (2009) observaram melhores taxas de crescimento nos tratamentos em que juvenis de cavalos-marinhos *H. erectus* foram alimentados somente com *Artemia* sp. viva, ou *Artemia* sp. viva mais *Mysis* spp. congelada, comparado ao tratamento em que os juvenis foram alimentados apenas com *Mysis* spp. congelada. Além disto, a transição de alimento vivo (*Artemia* sp.) para alimento congelado (*Mysis* spp.) foi mais satisfatória, em relação ao aumento do peso úmido e comprimento padrão, em juvenis maiores e com idades mais avançadas (63 e 70 DAN) comparado a juvenis menores e mais jovens (42 e 49 DAN).

Assim, a utilização de presas vivas ainda se faz necessária até fases mais avançadas de cultivo. Por causa das facilidades de obtenção e cultivo da *Artemia* sp., que pode ser utilizada com diferentes tamanhos e enriquecida com diversos produtos, este organismo ainda é considerado um dos alimentos vivos mais viáveis, tanto para produtores quanto para aquaristas.

Devido à grande quantidade de enriquecedores de alimento vivo para peixes marinhos disponível no mercado, algumas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de encontrar enriquecedores para *Artemia* sp. que otimizem o desempenho zootécnico de cavalos-marinhos. A composição centesimal, o perfil de ácidos graxos e de aminoácidos, entre outros macros e micronutrientes deste microcrustáceo, varia de acordo com o tipo de enriquecedor utilizado, mas também com o estágio de desenvolvimento e da espécie de *Artemia* sp., o que pode influenciar na digestibilidade e aproveitamento dos nutrientes (Conceição et al., 2010).

Bons resultados de sobrevivência e crescimento para várias espécies do gênero *Hippocampus* foram obtidos utilizando diferentes enriquecedores comerciais ou microalgas, ricos em ácidos graxos

essenciais. Shapawi e Pulser (2003) observaram melhor taxa de crescimento específico de juvenis de cavalos-marinhos *H. abdominalis* alimentados com *Artemia* sp. enriquecida com quatro tipos de enriquecedores comerciais, A1-Selco® e A1-DHA Selco® (Inve Aquaculture Inc., USA), e ALGAMAC-2000® e ALGAMAC 3010® (Aquafauna Biomarine Inc., EUA), e com um *mix* de microalgas, *Isochrysis galbana* e *Pavlova lutheri* (1:1), em comparação à juvenis alimentados com *Artemia* sp. não enriquecida, não havendo diferenças entre os enriquecedores comerciais e o enriquecimento com microalgas.

Entretanto, Palma et al. (2011) verificaram que o enriquecimento da *Artemia* sp. com a microalga *Chlorella* sp. foi mais satisfatório do que com o enriquecedor comercial DHA Selco® para alimentação de larvas e juvenis de cavalos-marinhos *H. guttulatus*. Estes autores observaram uma mortalidade completa dos animais alimentados com *Artemia* sp. enriquecida com este enriquecedor comercial nos primeiros 10 dias de cultivo, porém quando alimentados com *Artemia* sp. enriquecida com a microalga, foi observada uma sobrevivência de 60% dos animais no mesmo período, diminuindo para 20% de sobrevivência para animais com 25 DAN, e não havendo mais mortalidades até os animais completarem 120 DAN.

No presente trabalho, o melhor desempenho observado em juvenis de cavalos-marinhos *H. reidi* com 45 DAN, em relação ao peso, altura, comprimento total e ganho de peso, também foi obtido nos tratamentos em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com a microalga *N. oculata*, comparado aos tratamentos em que houve a utilização de enriquecedor comercial Red Pepper. Este fato pode estar relacionado a compostos bioativos entre outros nutrientes complementares que as microalgas podem possuir em relação aos enriquecedores comerciais (Conceição et al., 2010). De acordo com estes autores, além de ácidos graxo essenciais como PUFA e HUFA, necessários para o desenvolvimento de peixes marinhos, outros nutrientes, tais como outras classes lipídicas, certos peptídeos, aminoácidos livres, pigmentos, esteróis, minerais e vitaminas também podem ser de igual importância para o desenvolvimento desses organismos.

Wong e Benzie (2003) observaram maiores taxas de crescimento em juvenis de cavalos-marinhos *Hippocampus whitei* quando alimentados com *Artemia* sp. enriquecida com o enriquecedor comercial DC Selco® comparado a *Artemia* sp. não enriquecida, porém não houve diferenças no fator de condição. Estes autores concluem que o efeito do enriquecimento forneceu nutrientes essenciais, porém com pouca energia para o ganho de peso e para o aumento no fator de condição. No presente

estudo, foi observado que não houve diferença no fator de condição dos juvenis de *H. reidi* entre os diferentes tratamentos, tanto em juvenis com 45 DAN quanto com 60 DAN, resultados semelhantes aos observados por Wong e Benzie (2003).

Já em juvenis de *H. reidi* com 60 DAN, este estudo mostra que os diferentes enriquecimentos utilizados não afetaram os parâmetros zootécnicos dos animais. Porém, o probiótico comercial influenciou o crescimento como altura e comprimento total, se comparado aos tratamentos sem a adição de probiótico. Outras pesquisas também mostraram efeitos positivos de probióticos no desempenho zootécnico em peixes.

Avella et al. (2009) observaram melhores resultados de crescimento e sobrevivência de larvas e juvenis de peixe palhaço *Amphiprion ocellaris*, bem como uma redução do biomarcador de estresse GR (receptor intracelular glucocorticóide), que está diretamente relacionado com o nível de cortisol (hormônio relacionado ao estresse), mediante a adição de probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*) no alimento e na água de cultivo. Neissi et al. (2013) observaram melhores resultados de peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico do peixe ornamental *green terror Aequidens rivulatus* no grupo em que houve a adição de probiótico (*Pediococcus acidilactici*) na dieta, porém não houve diferença na sobrevivência entre os diferentes tratamentos.

Os resultados discrepantes aqui observados do efeito do enriquecedor e do probiótico em *H. reidi* com diferentes idades (45 e 60 DAN) podem ser atribuídos à possibilidade de diferentes exigências nutricionais de acordo com cada fase ontogenética dos animais (Sales e Janssens, 2003) como demonstrado para várias espécies de peixes. Por exemplo, Fiogbé e Kestemont (1995), observaram que a exigência proteica de larvas de peixe-dourado *Carassius auratus* é superior comparado à de juvenis, sendo 56% e 23% respectivamente. De acordo com estes autores, as diferentes exigências nutricionais de larvas e juvenis podem estar relacionadas ao processo de rápido crescimento das larvas, bem como a falta de um sistema seletivo de absorção de proteínas macromoleculares nas larvas em comparação aos juvenis.

Novelli et al. (2016) mostraram variações no desempenho de crescimento de larvas de *H. reidi*, conforme as diferentes idades e diferentes tipos de enriquecedores de *Artemia* sp. Estes autores observaram melhores resultados na taxa de crescimento absoluto e taxa de crescimento específico em larvas de 8 a 15 DAN, no tratamento em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com enriquecedor Easy Selco DHA (lipídeo/proteína: 67/0%). Em contrapartida, em larvas de 15 a 20 DAN,

os melhores resultados na taxa de crescimento absoluto, taxa de crescimento específico, aumento diário de peso e ganho de peso, foram observados no tratamento em que a *Artemia* sp. foi enriquecida com DHA Protein Selco (lipídeo/proteína: 27/29%).

Novelli et al. (2015), observaram a formação completa do sistema digestório de *H. reidi* em animais com aproximadamente 20 DAN, porém não há estudos complementares que comprovem que podem haver mudanças no processo de digestão, absorção de nutrientes e exigências nutricionais ao longo do desenvolvimento dos juvenis desta espécie. Desta forma, futuras pesquisas devem ser realizadas a fim de conhecer as exigências nutricionais de *H. reidi* em diferentes fases do seu desenvolvimento para adequar o tipo de alimento vivo e enriquecedor a ser utilizado.

No presente trabalho, a melhora no desempenho zootécnico com o uso de probióticos em animais somente aos 60 DAN, pode refletir a necessidade de um período maior de exposição ao probiótico, relacionado ao tempo de colonização das bactérias probióticas no trato digestório dos juvenis ou às próprias respostas dos juvenis frente a estas bactérias. O processo de colonização é caracterizado pela atração das bactérias a superfície da mucosa do trato digestório, seguido pela associação ao gel da mucosa ou a células epiteliais, e é influenciado por diversos fatores relacionados aos organismos hospedeiros, como a temperatura do corpo, níveis de potencial redox, enzimas ou resistências genéticas, ou a fatores relacionados ao próprio microrganismo, como produção de substâncias tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos, entre outras substâncias (Bálcazar et al., 2006). A colonização do trato digestório por bactérias probióticas é mais satisfatória quando a administração de probióticos é realizada nas fases iniciais de cultivo, antes da definitiva colonização da microbiota intestinal. Após este período, apenas adição de grandes doses de probióticos são capazes de provocar uma dominância das bactérias introduzidas no trato digestório dos animais hospedeiros (Bálcazar et al., 2006).

Ramos et al. (2013) observaram que a adição de probiótico comercial (*Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Lactobacillus* sp.) na ração para juvenis de truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* teve um efeito tardio no desempenho de crescimento dos animais, pois não houve diferença no ganho de peso em 28 dias, sendo que a diferença ocorreu somente aos 56 dias.

As bactérias probióticas podem atuar nos organismos hospedeiros, como promotores de crescimento, através de vários mecanismos, incluindo um aumento na disponibilidade de nutrientes, produção de

enzimas digestivas (ten Doeschate e Coyne, 2008) e estimulando a síntese de enzimas endógenas no trato digestório pelo hospedeiro, o que auxilia no processo de digestão e absorção dos nutrientes (Lazado et al., 2012).

Aqui não foi observado um aumento nas atividades enzimáticas analisadas (tripsina, quimotripsina e amilase) com a utilização do probiótico. Assim, a melhora no desempenho de crescimento dos juvenis de *H. reidi* somente aos 60 DAN em relação ao uso de probióticos também pode estar associado ao aporte de nutrientes provenientes do probiótico comercial ou aumento de outras enzimas que não foram aqui analisadas, como as lipases entre outras enzimas digestivas. Balcázar et al. (2006) relacionam o efeito do probiótico não somente ao aumento de enzimas extracelulares como protease, amilases e lipases, mas também ao fornecimento de vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos que servem como promotores de crescimento.

Apesar do presente estudo mostrar que o probiótico afetou o crescimento de juvenis de *H. reidi* somente aos 60 DAN, este produto não teve efeito positivo no controle de bactérias potencialmente patogênicas. Massucato (2016) utilizando o mesmo probiótico comercial ao do presente estudo, observou que os resultados de peso, altura e comprimento total de juvenis mais jovens (16 DAN) de *H. reidi* foram significativamente superiores no tratamento em que houve a adição de probiótico na água, apesar de não haver diferenças significativas nas contagens de bactérias heterotróficas totais (BHT), *Vibrio* spp. e bactérias ácido lácticas nos animais.

Estudos sobre a composição microbiana da flora do trato intestinal de *H. reidi* são escassos, porém em estudos com outras espécies de cavalos-marinhos, como por exemplo em *H. kuda*, Tanu et al. (2011) observaram 10 gêneros bacterianos com predominância dos gêneros *Vibrio* spp., *Enterovibrio* sp. e *Bacillus* spp. Estes autores observaram que as bactérias isoladas possuem a capacidade de degradar lipídeos, celulose, xilano, amido e proteínas, e a partir de análises enzimáticas constataram uma alta atividade de lipase, indicando que a flora bacteriana associada ao trato intestinal dos cavalos-marinhos é capaz de digerir alimentos ricos em lipídeos. Também demonstram a complexidade e as diferenças dos cavalos-marinhos em relação à muitas espécies de peixes marinhos, como a presença da bactéria *Burkholderia cenocepacia*, até então não relatada em trato gastrointestinal de peixes marinhos.

A baixa taxa de sobrevivência (entre 5,5% e 11,5%) aqui observada pode estar relacionada à doenças causadas por *Vibrio* spp. uma vez que altas concentrações foram detectadas nas análises microbiológicas dos animais com 60 DAN em ambos os tratamentos

analisados. Desta forma, a adição do probiótico comercial utilizado não foi efetiva no controle destes microorganismos. Apesar deste gênero bacteriano estar associado aos cavalos-marinhos e estar presente nos ambientes marinhos, os surtos de doenças acabam ocorrendo pela presença de fatores de estresse associados aos ambientes de cultivo (Austin e Austin, 2007; Martins et al., 2010), e algumas pesquisas demonstraram a patogenicidade de *Vibrio* spp. para estes peixes, como *Vibrio harveyi* em *H. kuda* (Tendencia, 2004), *Vibrio parahaemolyticus* em *H. erectus* (Lin et al., 2016), e *Vibrio alginolyticus* em *H. guttulatus* e *H. reidi* (Balcázar et al., 2010; Martins et al., 2010).

Outros estudos devem ser realizados para a identificação das bactérias presentes no trato digestório de *H. reidi*, em um ambiente específico de cultivo, para possível isolamento e emprego como probiótico para melhora no desempenho de crescimento, mas também no controle de agentes patogênicos.

5. CONCLUSÕES

A utilização de *N. oculata* no enriquecimento da *Artemia* sp. ofertada como alimento exclusivo pode aumentar o desempenho no crescimento dos juvenis de *H. reidi* em um primeiro momento, comparado ao enriquecedor comercial utilizado neste estudo. Além disto, o uso de probióticos para os cavalos-marinhos pode auxiliar como promotores de crescimento. Os resultados observados nas análises enzimáticas também são importantes como primeiras informações sobre a atividade de enzimas digestivas para esta espécie nas idades estudadas, fornecendo informações para futuras pesquisas com cavalos-marinhos. O presente estudo foi um dos poucos realizados com a espécie *H. reidi* nestas idades (30 a 60 DAN), e os resultados apontam que esta fase de cultivo também pode ser considerada crítica para a viabilidade da produção da espécie em escala comercial.

6. REFERÊNCIAS

Austin, B., Austin, D.A., Austin, B., Austin, D.A., 2012. Bacterial fish pathogens, Heidelberg, Germany: Springer.

Avella, M.A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A.R., Carnevali, O., 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish.

Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 298, R359–R371. doi:10.1152/ajpregu.00300.2009

Bálcázar, J.L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 114, 173–186. doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Balcázar, J.L., Lee, N.M., Pintado, J., Planas, M., 2010. Phylogenetic characterization and in situ detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulatus*) in captivity. Syst. Appl. Microbiol. 33, 71–77. doi:10.1016/j.syapm.2009.11.005

Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Res. Vet. Sci. 115, 66–77. doi:10.1016/j.rvsc.2017.01.016

Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. Aquac. Res. 41, 613–640. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x

DelMar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W., Geokas, M.C., 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal. Biochem., 99 (1979), pp. 316-320.

Erlanger, B.F., Kokawsky N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substances of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95, 271-278.

Felício, A.K.C., Rosa, I.L., Souto, A., Freitas, R.H.A., 2006. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. J. Ethol. 24, 219–225. doi:10.1007/s10164-005-0189-8

Fiogbé, E.D., Kestemont, P., 1995. An assessment of the protein and amino acid requirements in goldfish (*Carassius auratus*) larvae. Journal of Applied Ichthyology 11, 282-289. doi: 10.1111/j.1439-0426.1995.tb00028.x

Foster, S.J., 2016. Seahorses (*Hippocampus* spp.) and the CITES Review of Significant Trade. Fish. Cent. Res. Reports 24, 1–48.

Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, O.J., 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184, 303–314. doi:10.1016/S0044-8486(99)00322-1

Hora, M. dos S.C. da, Joyeux, J.C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292, 37–41. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.03.023

Hora, M. dos S.C. da, Joyeux, J.C., Rodrigues, R.V., Sousa-Santos, L.P. de, Gomes, L.C., Tsuzuki, M.Y., 2016. Tolerance and growth of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* at different salinities. *Aquaculture* 463, 1–6. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.05.003

Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131–152. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.11.010

Lazado, C.C., Caipang, C.M.A., Kiron, V., 2012. Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquac. Nutr.* 18, 423–431. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00928.x

Lin, Q., Gao, Y., Sheng, J., Chen, Q., Zhang, B., Lu, J., 2007. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 262, 481–492. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.011

Lin, Q., Lin, J., Zhang, D., Wang, Y., 2009. Weaning of juvenile seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810 from live to frozen food. *Aquaculture* 291, 224–229. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.03.031

Lin, T., Zhang, D., Liu, X., Xiao, D., 2016. Variations of immune parameters in the lined seahorse *Hippocampus erectus* after infection with enteritis pathogen of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 50, 247–254. doi:10.1016/j.fsi.2016.01.039

Lourie, S. a, Foster, S.J., Cooper, E.W.T., Vincent, A.C.J., 2004. A Guide to the Identification of Seahorses A, North.

Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Fezer, G.F., Buglione Neto, C.C., Garcia, P., Silva, B.C., Jatobá, a, Vieira, F.N., 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. Braz. J. Biol. 70, 205–209. doi:10.1590/S1519-69842010000100028

Mélo, R.C.S., Santos, L.P. de S., Brito, A.P.M., Gouveia, A. de A., Maçal, C., Cavalli, R.O., 2016. Use of the microalga *Nannochloropsis oculata* in the rearing of newborn longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) juveniles. Aquac. Res. 47, 3934–3941. doi:10.1111/are.12843

Neissi, A., Rafiee, G., Nematollahi, M., Safari, O., 2013. The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. Fish Shellfish Immunol. 35, 1976–1980. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.036

Noelting, G., Bernfeld, P., 1948. Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. Helvetica Chimica Acta, v. 31, n. 1, 286-290.

Novelli, B., Otero-Ferrer, F., Diaz, M., Socorro, J.A., Caballero, M.J., Domínguez, L.M., Moyano, F.J., 2016. Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). Aquaculture 464, 196–204. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.06.037

Novelli, B., Socorro, J.A., Caballero, M.J., Otero-Ferrer, F., Segade-Botella, A., Molina Domínguez, L., 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. Fish Physiol. Biochem. 41, 1233–1251. doi:10.1007/s10695-015-0082-5

Olivotto, I., Avella, M.A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. Aquaculture 283, 92–96. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.018

Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. J. World Aquac. Soc. 42, 135–166. doi:10.1111/j.1749-7345.2011.00453.x

Palma, J., Bureau, D.P., Andrade, J.P., 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. Aquaculture 318, 439–443. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.05.035

Ramos, M.A., Weber, B., Gonçalves, J.F., Santos, G.A., Rema, P., Ozório, R.O.A., 2013. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 166, 302–307. doi:10.1016/j.cbpa.2013.06.025

Rosa, I.L., Alves, R.R.N., Bonifácio, K.M., Mourão, J.S., Osório, F.M., Oliveira, T.P.R., Nottingham, M.C., 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. J. Ethnobiol. Ethnomed. 1, 12. doi:10.1186/1746-4269-1-12

Sales, J., Janssens, G.P.J., 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. Aquat. Living Resour. 16, 533–540. doi:10.1016/j.aquiliv.2003.06.001

Shapawi, R., Purser, G.J., 2003. The Value of Enriched *Artemia* in Supporting Growth and Survival of Juvenile Pot-bellied Seahorses *Hippocampus abdominalis*. J. World Aquac. Soc. 34, 533–541. doi:10.1111/j.1749-7345.2003.tb00093.x

Tanu, Deobagkar, D.D., Khandeparker, R., Sreepada, R.A., Sanaye, S. V., Pawar, H.B., 2012. A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): Characterization and extracellular enzymes. Aquac. Res. 43, 386–394. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02841.x

ten Doeschate, K.I., Coyne, V.E., 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. Aquaculture 284, 174–179. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.07.018

Tendencia, E.A., 2004. The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines. Aquac. Res. 35, 1292–1294. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01109.x

Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M. V, Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. Aquaculture 360–361, 10–16. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.06.025

Wong, J.M., Benzie, J.A.H., 2003. The effects of temperature, Artemia enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. Aquaculture 228, 107–121. doi:10.1016/S0044-8486(03)00320-X

Woods, C.M.C., 2003a. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. Aquaculture 220, 287–298. doi:10.1016/S0044-8486(02)00227-2

Woods, C.M.C., 2003b. Effects of varying Artemia enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. Aquaculture 220, 537–548. doi:10.1016/S0044-8486(02)00639-7

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AKHTER, N. et al. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, [S.l.], v. 45, n. 2, p. 733-741, 2015.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish*. 4 ed. Chichester: Springer. 594 p.

BALCÁZAR, J. L. et al. Phylogenetic characterization and in situ detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulatus*) in captivity. *Systematic And Applied Microbiology*, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 71-77, 2010.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research In Veterinary Science*, [S.l.], v. 115, p. 66-77, 2017.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, [S.l.], v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASTRO, A. L. da C. et al. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei. Neotropical Ichthyology, [S.l.], v. 6, n. 4, p. 637-644, 2008.

CELINO, F. T. et al. Feeding selectivity of the seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker), juveniles under laboratory conditions. *Aquaculture Research*, [S.l.], v. 43, n. 12, p. 1804-1815, 2011.

CHEN, L.; WANG, X.; HUANG, B. The genus *Hippocampus*—A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, [S.l.], v. 162, p. 104-111, 2015.

CITES – Convention on international trade in endangered species of wild flora and fauna. Disponível em: <http://www.cites.org>. Acesso em: 05 de janeiro de 2017.

CONCEIÇÃO, L. e C. et al. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, [S.l.], v. 41, n. 5, p. 613-640, 2010.

COPEMAN, L.a. et al. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, [s.l.], v. 210, n. 1-4, p.285-304, jul. 2002.

CURTIS, J. R. M.; VICENT, A. C. J. Life history of an unusual marine fish: survival, growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. *Journal of Fish Biology*, [S.l.], v. 68, n. 3, p. 707-733, 2006.

DIAS, T. L. P.; ROSA, I. L. Habitat preferences of a seahorse species, *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. *Aqua, Journal of Ichthyology and aquatic biology*, [S.l.], v.6, n.4, p. 165-176, 2003.

FELÍCIO, A. K. C. et al. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. *Journal of Ethology*, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 219-225, 2006.

FOSTER, S. J.; VINCENT, A. C. J. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal Of Fish Biology*, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 1-61, 2004.

FOSTER, S. J.; WISWEDEL, S.; VINCENT, A. C. J. Opportunities and challenges for analysis of wildlife trade using CITES data - seahorses as a case study. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 154-172, 2014.

FOSTER, S. J. Seahorses (*Hippocampus* spp.) and the CITES Review of Significant Trade. *Fisheries Centre Research Reports*, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 1-48, 2016.

FROESE, R.; PAULY, D.. FishBase. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, [S.l.], v. 184, n. 3-4, p. 303-314, 2000.

HERCOS, A. T; GIARRIZZO, T. Pisces, Syngnathidae, *Hippocampus reidi*; Filling distribution gaps. Check List, 3, p. 287–290, 2007.

HERNÁNDEZ, D. de La N. et al. Fidelidad al sitio y rango de hogar del caballito de mar narizón *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) en la dársena de Varadero, noroeste de Cuba. Revista Ciencias Marinas y Costeras, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 95-112, 2016.

HIDALGO, M. C. et al. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture, [S.l.], v. 170, n. 3-4, p. 267-283, 1999.

HORA, M. dos S. C. da; JOYEUX, J. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. Aquaculture, [S.l.], v. 292, n. 1-2, p. 37-41, 2009.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/destaques-e-eventos/474-realizada-oficina-de-consolidacao-do-pancorais>. Acesso em: 10 de dezembro de 2016.

KENDRICK, A. J.; HYNDES, G. A. Variations in the dietary compositions of morphologically diverse syngnathid fishes. Environmental Biology Of Fishes, [S.l.], v. 72, n. 4, p. 415-427, 2005.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, [S.l.], v. 41, n. 2, p. 103-125, 1998.

KOLDEWEY, H. J.; MARTIN-SMITH, K. M. A global review of seahorse aquaculture. Aquaculture, [S.l.], v. 302, n. 3-4, p. 131-152, abr. 2010.

LENOIR, D. S. et al. Effects of first feeding on survival, growth and lipid composition of short-snouted seahorse juveniles, *Hippocampus hippocampus*, (Linnaeus). Book of Abstracts XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, p. 315, 2008.

LIN, Q. et al. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*, [S.l.], v. 262, n. 2-4, p. 481-492, 2007.

LIN, Q.; LIN, J.; ZHANG, D. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, [S.l.], v. 277, n. 3-4, p. 287-292, jun. 2008.

LIN, T. et al. Tingting et al. Variations of immune parameters in the lined seahorse *Hippocampus erectus* after infection with enteritis pathogen of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, [S.l.], v. 50, p. 247-254, 2016.

LOURIE, S. A. et al. A guide to the identification of seahorses. Washington: Project Seahorse and traffic North America. University of British Columbia and World Wildlife Fund, 2004.

LOURIE, S. A.; POLLON, R. A.; FOSTER, S. J. A global revision of the Seahorses *Hippocampus* Rafinesque 1810 (Actinopterygii: Syngnathiformes). *Zootaxa*, [S.l.], v. 4146, n. 1, p. 1-10, 1 ago. 2016.

MARTINEZ-CARDENAS, L.; PURSER, G. J. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). *Aquaculture*, [S.l.], v. 264, n. 1-4, p. 92-100, 2007.

MARTINS, M. L. et al. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, [S.l.], v. 70, n. 1, p. 205-209, 2010.

MASSUCATTO, A. Influência do copépodo *Acartia* sp. e uso de probiótico nos estágios iniciais de cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Aquicultura, Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração. Instrução Normativa nº 05, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da União. n.102, p.136-142, 2004.

- NETO, A. R. R. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO TRATO DIGESTÓRIO DO CAVALO-MARINHO *Hippocampus reidi* (GINSBURG, 1933) [PERCOMORPHA, GASTEROSTEIFORMES, SYNGNATHIDAE]. 200. 14 f. TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Santa Cecília, Santos, 2000.
- NOVELLI, B. et al. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. *Fish Physiology And Biochemistry*, [S.l.], v. 41, n. 5, p. 1233-1251, 2015.
- NOVELLI, B. et al. Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). *Aquaculture*, [S.l.], v. 464, p. 196-204, 2016.
- OLIVOTTO, I. et al. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture*, [S.l.], v. 283, n. 1-4, p. 92-96, 2008.
- OLIVOTTO, I. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, [S.l.], v. 42, n.2, p. 135-166, 2011.
- OZÓRIO, F. M. ESTUDO POPULACIONAL DO CAVALO-MARINHO *HIPPOCAMPUS REIDI* GINSBURG, 1933 (TELEOSTEI: SYNGNATHIDAE) EM DOIS ESTUÁRIOS CEARENSES. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Marinhas Tropicais, Instituto Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- PALMA, J.; BUREAU, D. P.; ANDRADE, J. P. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, [S.l.], v. 318, n. 3-4, p. 439-443, 2011.
- PENG, W. D.; CHEN, Q. L. Anti-fatigue effect of enzymatic extract of *Hippocampus*. *Chinese Journal of Food Hygiene*, [S.l.], v. 17, n.5, p. 404-407, 2005.
- QIAN, Z. et al. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of the extracts from seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeler.

Biotechnology and Bioprocess Engineering, [S.l.], v. 13, n. 6, p. 705-715.

ROSA, I. L.; DIAS, T. L.; BAUM, J. K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). Environmental Biology Of Fishes, Netherlands, v. 64, p. 378-378, 2002.

ROSA, I. L. et al. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. Journal Of Ethnobiology And Ethnomedicine, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 12-27, 2005.

ROSA, I. L. et al. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). Neotropical Ichthyology, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 405-414, set. 2007.

ROSA, I. L. et al. Fisheries and trade of seahorses in Brazil: historical perspective, current trends, and future directions. Biodiversity And Conservation, [S.l.], v. 20, n. 9, p. 1951-1971, 2011.

RYU, B. et al. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- κ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. Chemico-Biological Interactions, [S.l.], v. 184, n. 3, p. 413-422, 2010.

SARGENT, John et al. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture, [s.l.], v. 177, n. 1-4, p.191-199, jul. 1999.

SHE, M. et al. An experimental study of five species halobios on anti-aging activity. Chinese Journal of Marine Drugs, [S.l.], v. 54, p. 30-34, 1995.

SILVEIRA, R. B. Sobre o comportamento sexual do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Pisces: Syngnathidae) em laboratório. Biociências, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 20-32, 2009.

SILVEIRA, R. B. Registros de cavalos-marinhos (Syngnathidae: *Hippocampus*) ao longo da costa brasileira. Oecologia Australis, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 316-325, 2011.

- SILVEIRA, R. B.; FONTOURA, N. F. Fecundity and fertility of the longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae), in tropical Brazil. *Brazilian Journal Of Biosciences*, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 362-367, 2010.
- TENDENCIA, E. A. The first report of *Vibrio harveyi* infection in the sea horse *Hippocampus kuda* Bleekers 1852 in the Philippines. *Aquaculture Research*, [S.l.], v. 35, n. 13, p. 1292-1294, 2004.
- VICENT, A. C. J. et al. The role of CITES in the conservation of marine fishes subject to international trade. *Fish and Fisheries*, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 563-592, 2013.
- WALFORD, J.; LAM, T. J. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, [S.l.], v. 109, n. 2, p. 187-205, 1993.
- WATANABE, Takeshi. Importance of Docosahexaenoic Acid in Marine Larval Fish. *Journal Of The World Aquaculture Society*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.152-161, jun. 1993.
- WILLADINO, L. et al. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture*, [S.l.], v. 360-361, p. 10-16, 2012.
- WOODS, C. M. C. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture*, [S.l.], v. 190, n. 3-4, p. 377-388, 2000.
- WOODS, C. M. C. Effects of varying *Artemia* enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture*, [S.l.], v. 220, n. 1-4, p. 537-548, 2003.
- WOODS, C. M. C. Evolution of VI-alpha and PIT-tagging of the seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture International*, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 175-186, 2005.
- XU, D. H. et al. The pharmacological effects of *Hippocampus* capsule on enhancing sexual functions of rats. *Jorunal of Chinese Medicinal Materials*, [S.l.], v. 26, n. 11, p. 807-808, 2003.

XU, D. H. et al. Protective effects of seahorse extracts in a rat castration and testosterone-induced benign prostatic hyperplasia model and mouse oligospermism model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, [S.l.], v. 37, n. 2, p. 679-688, 2014.

ZHU, A. M. Pharmacologic researches on ethanol extracts from Hippocampus. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 23-24, 2005.

ANEXOS

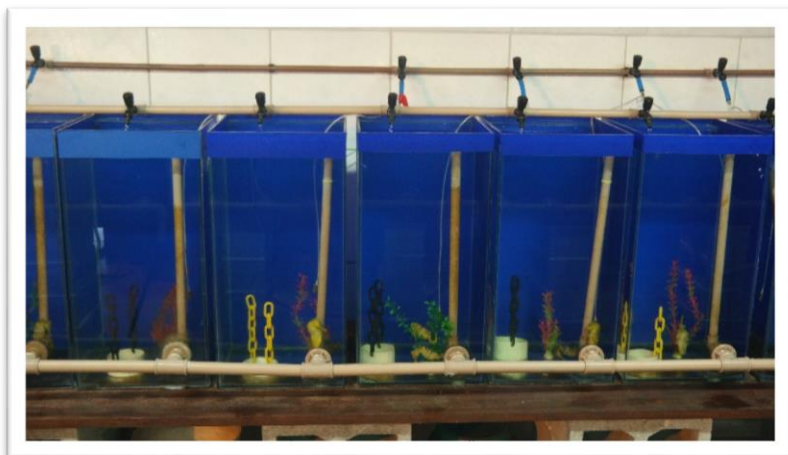


Figura a. Sistema de manutenção dos casais de reprodutores de cavalos-marinhos *H. reidi* do LAPOM. Fonte: Autor, 2016.



Figura b. Larvas de *H. reidi* provenientes de um casal de reprodutores mantidos no LAPOM. Fonte: Autor, 2016



Figura c. Microalga *N. oculata* produzida no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA – UFSC) e mantidas no LAPOM. Fonte: Autor, 2016.



Figura d. Enriquecimento da *Artemia* sp. utilizadas no experimento. Fonte: Autor, 2016.

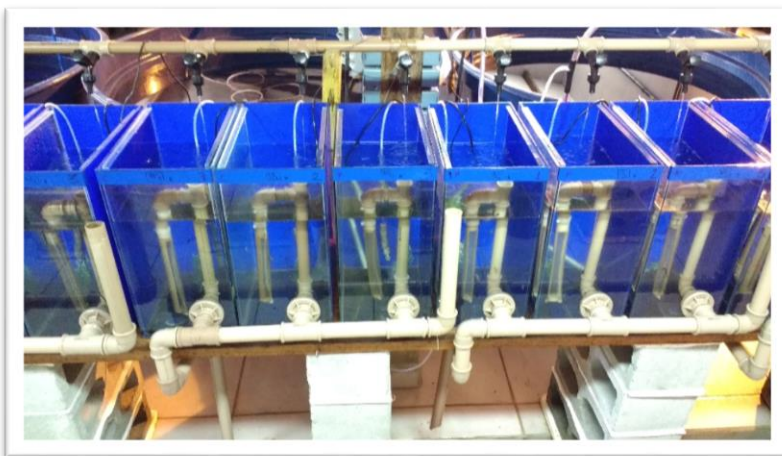


Figura e. Sistema de cultivo de juvenis de *H. reidi* utilizado no experimento deste trabalho. Fonte: Autor, 2016.

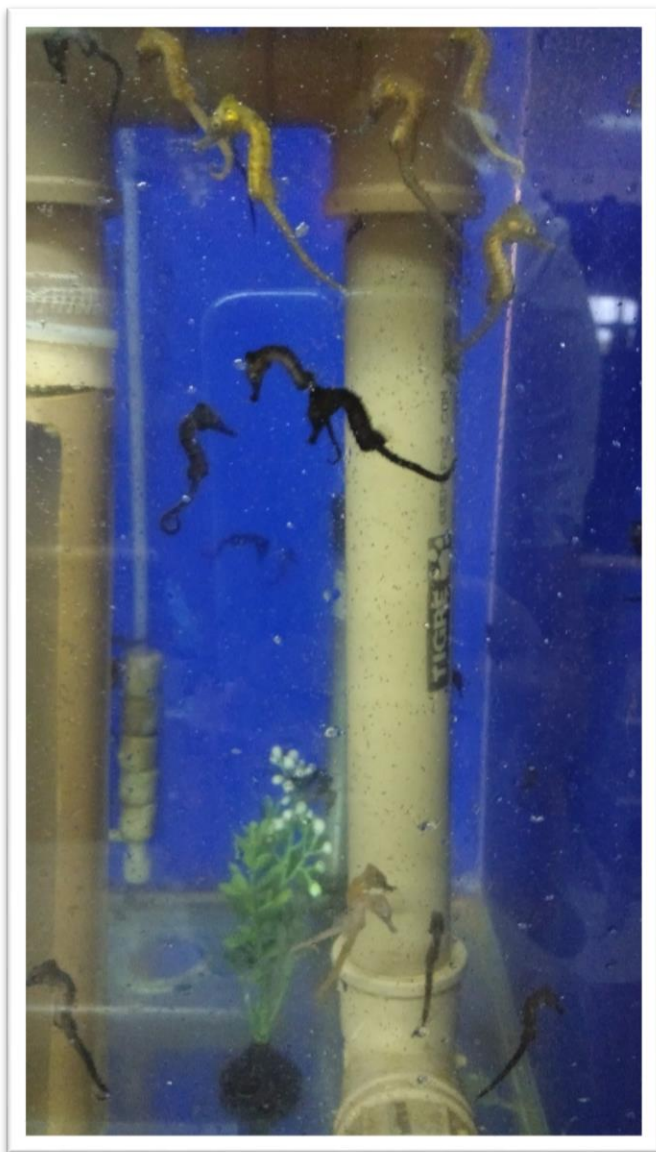


Figura f. Juvenis de *H. reidi* utilizados no experimento deste trabalho.
Fonte: Autor, 2016.